

**Proteínas de unión a DNA metilado y cáncer:
familia MBD (*Methyl-CpG Binding Domain*)**

Lidia López Serra
Departamento de Biología Molecular

Director de tesis: Dr. Manel Esteller



2007

Dr. Manel Esteller Badosa, jefe del laboratorio de Epigenética del Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y profesor del departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA

Que el trabajo titulado “Proteínas de unión a DNA metilado y cáncer: familia MBD (*Methyl-CpG-Binding Domain*)” que presenta Lidia López Serra para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo mi dirección en el laboratorio de Epigenética del Cáncer del CNIO y reúne, a mi juicio, la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid a 11 de Octubre de 2007.

Dr. Manel Esteller Badosa

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Laboratorio de Epigenética del Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y por una Beca de Formación en Investigación Predoctoral (BEFI) otorgada por el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.

Indice

English abstract	12
Introducción	17
1. Cromatina.....	19
1.1 <i>Histone fold</i>	23
2. Epigenética.....	24
2.1 Modificaciones de Histonas.....	26
2.1.1 Acetilación	28
2.1.2 Metilación.....	31
2.1.3 Fosforilación.....	33
2.1.4 Ubiquitinación.....	34
2.1.5 Sumoilación.....	34
2.1.6 Ribosilación.....	35
2.1.7 Isomerización de la prolina	35
2.2 Complejos remodeladores de la cromatina.....	36
2.3 Metilación del DNA	37
2.3.1 DNMT (<i>DNA Methyltransferases</i>).....	39
2.3.2 Proteínas de unión a DNA metilado: familia MBD	42
2.3.2.1 MeCP2	45
2.3.2.2 MBD1	47
2.3.2.3 MBD2	50
2.3.2.4 MBD3	52
2.3.2.5 MBD4	55
2.3.3 Otras proteínas de unión a DNA metilado	56
2.4 Complejo Polycomb	57
2.5 miRNA.....	58
3. Epigenética y cáncer	60
 Objetivos	 65
 Material y métodos	 71
1. Cultivo de líneas celulares	73
2. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina.....	73
3. Extracción de DNA de células en cultivo	73
4. Análisis de metilación del DNA	74
4.2 Secuenciación de DNA modificado con bisulfito Sódico	75
4.3 PCR específica de metilación (MSP, <i>Methylation Specific PCR</i>)...	76
5. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, Chromatin Immunoprecipitation assay).....	77
6. Análisis de expresión por RT-PCR.....	79

7. Análisis de expresión proteica	79
7.1 Obtención de extractos proteicos totales	79
7.2 Medición de la concentración proteica	80
7.3 Análisis de expresión por <i>Western blot</i>	80
8. Transfección de siRNA	83
9. Análisis de expresión global por microarray	84
10. Clonación en el vector de expresión pCDNA3.1(+).	85
11. Transfección y selección de clones	85
12. Ensayo de crecimiento.	86
13. Ensayo de formación de colonias.	86
14. Implante subcutáneo de células en ratones atímicos.....	87
15. Análisis de modificaciones de histonas.	87
15.1 Extracción ácida de histonas.....	87
15.2 Purificación de las fracciones de histonas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa.	88
15.3 Análisis de las fracciones de histonas purificadas mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE).....	88
16. Expresión de proteínas	88
16.1 Clonación de las isoformas de MBD1	88
16.2 Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i>	89
16.3 Purificación de proteínas fusionadas a 6xHistidina.....	90
17. Bicatenización de oligonucleótidos complementarios y biotinilación de extremos.	91
18. Análisis de afinidad por SPR (Surface Plasmon Resonance).	92
Resultados	94
Caracterización del patrón de unión de proteínas MBD (Methyl-CpG Binding Domain) a genes supresores de tumores hipermetilados en cáncer	97
1.1 Análisis de la expresión de proteínas MBD en líneas celulares de origen tumoral.....	97
1.2 Perfil de unión de proteínas MBD a islas CpG de genes implicados en desarrollo y progresión tumorales en líneas celulares de cáncer humano.	100
1.3 La hipermetilación de las islas CpG de los genes analizados se asocia con silenciamiento transcripcional.	108
Análisis de los efectos de la eliminación de las proteínas MBD sobre la expresión génica y la estructura de la cromatina	111
2.1 Inhibición de la expresión de las proteínas MBD mediante siRNA.	111
2.2 La eliminación de las proteínas MBD por siRNA da lugar a una estructura de la cromatina asociada a activación transcripcional.	112

2.3 La eliminación de las proteínas MeCP2, MBD1 y MBD2 da lugar a sobre-expresión génica en células HeLa.	118
2.4 Análisis de metilación de los genes sobre-expresados.	123
2.5 La hipermetilación de las islas CpG es independiente de la presencia de proteínas MBD.	127
2.6 Las proteínas MBD se encuentran unidas a los promotores hipermetilados.	128
2.7 Las islas CpG hipermetiladas de forma aberrante en HeLa también se encuentran hipermetiladas en líneas celulares representativas de los tipos de cáncer humano más frecuentes.	130
2.8 Las islas CpG hipermetiladas se asocian con represión transcripcional y el tratamiento con el agente desmetilante 5'aza-2-desoxicitidina da lugar a la re-expresión génica.	133
2.9 Las islas CpG de los genes seleccionados están hipermetilados en tumores primarios.	135
2.10 La reintroducción de FGF19 y PARVG inhibe la capacidad proliferativa de la línea celular HeLa	138
2.11 Ratones atímicos.	140
Clonación de nuevas isoformas de MBD1 y caracterización in vitro de las constantes de afinidad de las isoformas MBD1 Δ 10,12,15b; MBD1 Δ 10,15b; MBD1 Δ 10 y MBD1 Δ 15b	141
3.1 Clonación de las isoformas de MBD1 en pET21b y expresión en BL21(DE3).	141
3.2 Análisis de afinidad por SPR (<i>Surface Plasmon Resonance</i>).	142
Discusión	147
Conclusiones	165
Bibliografía	169
Anexo I	197

English abstract

DNA methylation is one of the most known epigenetic mark and has been related with genomic stability. It is also well known that in cancer aberrantly DNA methylation of CpG islands at many promoter regions leads to gene repression, including silencing of tumor suppressor and DNA repair genes.

Methyl-CpG binding (MBDs) proteins are key elements in mediating DNA methylation-dependent gene silencing. We are undertaking several approaches to investigate their relevance in the epigenetic inactivation of tumor suppressor and DNA repair genes in human cancer. Firstly, we have analyzed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses with specific antibodies against MBDs their recruitment to a large panel of promoters of methylated genes in cell lines representing different types of cancer. Secondly, we have investigated the consequences of MBD depletion by combining RNA interference experiments for each MBD protein with global expression analysis using microarray technology. A number of genes had their expression levels increased as a consequence of MBD depletion. Bisulfite genomic sequencing has revealed that many of the upregulated genes are methylated. We have used individual ChIP assays to investigate the presence of MBDs at the promoter of these methylated genes. We have also demonstrated that a significant number of these genes are methylated in primary tumors indicating that our strategy is useful to identify novel genes that are methylated in cancer. Finally, we have seen that reexpression of those methylated genes in HeLa leads to growth arrest, colony formation depletion and nude mice tumor suppression.

In this work we have cloned and characterized a new MBD1 isoform for a total of 7 isoforms. The *in vitro* biochemistry characterization of 4 of these 7 MBD1 isoforms using Surface Plasmon Resonance technology shed more information about the affinity of these isoforms for DNA both methylated and non-methylated, as well as the role of the domain CxxC3 on non-methylated DNA binding.

Our results not only support an essential role of this family of proteins in the epigenetic inactivation of hypermethylated genes but also shed light on the mechanisms of specific association of MBDs to different methylated sequences.

Introducción

1. Cromatina.

El DNA de los organismos eucariotas se encuentra en el interior del núcleo celular interaccionando con proteínas formando una estructura llamada cromatina. Entre las proteínas que forman la cromatina junto al DNA destacan las histonas. Las histonas son proteínas altamente conservadas ricas en aminoácidos básicos alrededor de las cuales se enrolla el DNA formando la unidad fundamental de la cromatina, el nucleosoma.

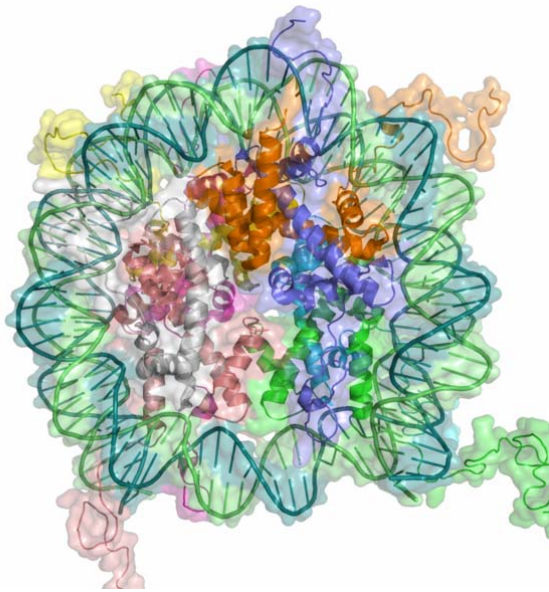


Figura 1. Esquema de la estructura de la partícula *core* del nucleosoma. La hélice azul y verde representa el DNA, las histonas se representan como hélices de distintos colores (verde: H3, naranja: H4, rosa: H2A y púrpura: H2B).

El nucleosoma está formado por un octámero de histonas (dos unidades de cada histona H2A, H2B, H3 y H4) alrededor del cual se disponen 147 pares de bases de DNA que dan 1,67 vueltas superhelicoidales levógiras (Thomas y Kornberg, 1975; Luger *et al.*, 1997; Richmond y Davey, 2003; Davey *et al.*, 2002) dando lugar a la partícula *core* (figura 1). El nucleosoma lo completa un fragmento de DNA de longitud variable de

entre 10 y 90 pares de bases llamado DNA *linker* que conecta cada partícula *core* con las adyacentes.

La sucesión de nucleosomas da lugar a una fibra polinucleosomal de unos 10 nm de diámetro. Esta cadena se pliega sobre sí misma para dar lugar a una fibra irregular de unos 30-40 nm de diámetro estabilizada por la unión a cada nucleosoma de una proteína llamada histona H1 (Dorigo *et al.*, 2004). Además de las histonas, la estructura de la fibra de 30 nm está regulada y estabilizada por otras proteínas que dan lugar a los niveles superiores de organización de la cromatina hasta llegar al nivel de compactación del cromosoma (figura 2).

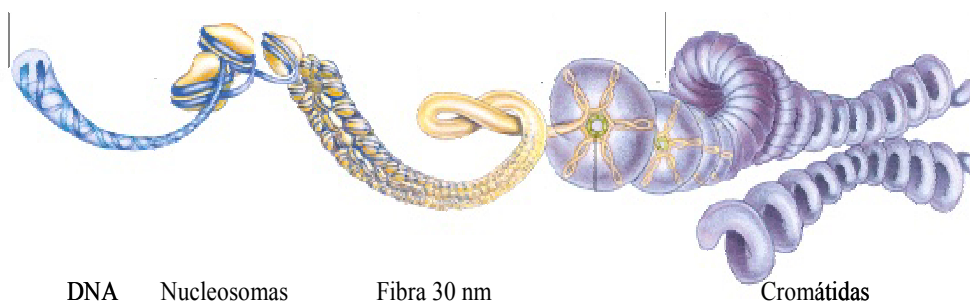


Figura 2. Esquema de los niveles de organización del DNA en el interior del núcleo de las células eucariotas.

Las histonas se encuentran altamente conservadas en todos los eucariotas (De Lange *et al.*, 1969; Thatcher y Gorovsky, 1994). Esto sugiere que la estructura fundamental de la cromatina aparece de forma muy temprana en la evolución de los eucariotas probablemente para solucionar el problema del empaquetamiento del DNA dentro del núcleo (Slesarev *et al.*, 1998). Proteínas equivalentes a las histonas se han encontrado incluso en el reino de las Arqueobacterias donde no sólo tienen funciones de empaquetamiento sino que intervienen también en la regulación de la

expresión génica (Sandman *et al.*, 1998; Ouzounis y Kyrpides, 1996; Bailey y Reeve, 1999; Dinger *et al.*, 2000).

La función de la cromatina no sólo es organizar el empaquetamiento del material genético en el núcleo de la célula eucariota. La cromatina es una estructura muy dinámica que afecta a todos los procesos metabólicos relacionados con el DNA como la transcripción génica, la recombinación, la reparación de daños, la replicación, la formación de cinetocoros y centrómeros, y el mantenimiento de los telómeros. Por lo tanto, el hecho de que el DNA se encuentre formando parte de una estructura como la cromatina tiene implicaciones en el procesamiento de la información genética por influir en la forma en que esta es leída (Van Holde, 1998). Hace tiempo que ha sido abandonada la idea del DNA como molécula en cuya secuencia está depositada toda la información, independientemente del resto de elementos de la cromatina por una visión más ajustada a la realidad en la que el procesamiento de la información depende de la actividad de una gran cantidad de enzimas y proteínas reguladoras que llevan a cabo reacciones bioquímicas que determinan su estructura y que controlan todos los procesos celulares que tienen lugar sobre el DNA (Felsenfeld y Groudine, 2003). En células eucariotas, esta información inherente a la organización del DNA viene determinada principalmente por las modificaciones covalentes postraduccionales que tienen lugar sobre los extremos aminoterminales de las histonas (Zhan y Reinberg, 2001), el cambio conformacional y de posicionamiento de los nucleosomas sobre la secuencia de DNA (Becker y Horz, 2002), la existencia de variantes de histonas (Ahmad y Henikoff, 2002; Redon *et al.*, 2002; Smith, 2002), la metilación del DNA en los residuos citosina en el contexto del dinucleótido CpG (Ehrlich *et al.*, 1982; Keshet *et al.*, 1986), el empaquetamiento de los nucleosomas en dominios abiertos o cerrados determinados por estructuras de orden superior de la cromatina (Hall *et al.*, 2002; Allshire, 2002) y la organización de estos dominios en compartimentos nucleares específicos

(Andrulis *et al.*, 1998; Laroche *et al.*, 1998; Cremer y Cremer, 2001; Belmont, 2003; Isogai y Tjian, 2003).

La estructura del nucleosoma está considerada generalmente como represora de la transcripción, aunque las células eucariotas han desarrollado mecanismos para regular este efecto. El DNA enrollado sobre el octámero de histonas es accesible sólo parcialmente a las proteínas reguladoras de la transcripción pero puede quedar más expuesto si el nucleosoma se desplaza de sitio o si el DNA se desenrolla parcialmente del octámero debido a cambios conformacionales de la estructura del nucleosoma. Por un lado, las células disponen de complejos enzimáticos dependientes de ATP que pueden reposicionar y/o modificar la estructura del nucleosoma (Becker y Horz, 2002). Por otro lado, existen enzimas que pueden modificar covalentemente los extremos N-terminales de las histonas provocando un cambio en la estructura del nucleosoma y modificando los contactos internucleosomales (Zhang y Reinberg, 2001). Entre las modificaciones postraduccionales que tienen lugar en los extremos N-terminales de las histonas y que están íntimamente relacionados con la regulación de diversos procesos nucleares se encuentran la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la ADP-ribosilación y la sumoilación, con unos efectos locales muy importantes sobre la cromatina (Kouzarides, 2007).

Existen además variantes de histonas, como H3.3, H2AZ, H2ABbd o H2A.X, que se localizan en regiones especializadas de la cromatina. Se diferencian de las histonas canónicas en que no se sintetizan en la fase S del ciclo celular y en que se incorporan a la cromatina de forma independiente a la replicación del DNA.

Otras proteínas diferentes a las histonas, así como moléculas de RNA no codificante, también se encuentran implicadas en la estructura de la cromatina y por tanto en la regulación de su función (Allshire, 2002). Entre el conjunto de proteínas no histonas más abundantes se encuentra una

superfamilia de proteínas llamada HMG (*High Mobility Group*). Las proteínas HMG se agrupan en una superfamilia por sus similitudes en propiedades físicas y químicas y porque todas ellas actúan como elementos arquitectónicos que afectan a muchos procesos en el contexto de la cromatina. Dentro de la superfamilia se distinguen tres familias, HMGA, HMGB y HMGN. Todas presentan un dominio rico en aminoácidos ácidos en el extremo C-terminal pero cada familia tiene un motivo funcional distinto, por lo que inducen cambios específicos en sus sitios de unión y participan en distintas funciones celulares (Hock *et al.*, 2006).

1.1 *Histone fold*.

Las histonas, al formar el octámero, adoptan una estructura muy característica en la que destaca un motivo estructural muy conservado llamado *histone fold*. Este motivo estructural con aproximadamente 65 aminoácidos está formado por 3 hélices que le permiten conectarse interdigitalmente con las 3 hélices del *histone fold* de la histona con que forma pareja en el dímero, estabilizando la estructura del octámero (Arents *et al.*, 1991; Arents y Moudrianakis, 1995; Luger *et al.*, 1997). Al igual que la secuencia de las histonas, el *histone fold* es un motivo muy conservado desde el punto de vista estructural, aunque se da cierto grado de variabilidad en la secuencia del *histone fold* tanto entre las cuatro clases de histonas como entre histonas de la misma clase de diferentes especies (Sullivan y Landman, 2003). Además, el motivo estructural del *histone fold* se encuentra no sólo en las histonas, sino también en proteínas de unión a DNA de euriarqueobacterias (Pereira y Reeve, 1998) así como en diversos tipos de proteínas no histonas con funciones sobre la regulación transcripcional y estructura del DNA (Sullivan *et al.*, 2000).

Las regiones que se encuentran fuera del *histone fold* también se encuentran altamente conservadas, sobretodo los residuos modificables postraduccionalmente de los extremos N-terminales. Estas regiones de las

histonas tienen generalmente una estructura flexible e irregular, y sólo aquellos residuos que pasan a través de las vueltas de la superhélice de DNA se encuentran fijos (Luger *et al.*, 1997). Los extremos N-terminales son extremadamente básicos por la alta proporción de lisinas y argininas, y es sobre estos aminoácidos donde tienen lugar la mayor parte de las modificaciones postraduccionales, esenciales para la regulación de la estructura superior de la cromatina y de su función (Jenuwain y Allis, 2001).

2. Epigenética.

La epigenética ha sido recientemente definida por Adrian Bird como el estudio de la adaptación estructural de regiones cromosómicas para registrar, señalar o perpetuar estados de actividad alterados (Bird, 2007), es decir, el estudio de todos los mecanismos implicados en la regulación de las funciones de la cromatina. Clásicamente la epigenética ha sido definida como la ciencia que estudia los cambios en la expresión de los genes heredables mitótica o meióticamente que no vienen determinados por cambios en la secuencia del DNA. Pero esta visión clásica hay que redefinirla por varios motivos; en primer lugar, la ambigüedad del término “heredable” ya que no todas las modificaciones que se dan sobre las histonas son heredables (o al menos no ha sido demostrado), sin embargo, muchas de ellas, como la acetilación y la metilación, vienen determinadas por el patrón de metilación del DNA, que sí lo es, por lo que se puede considerar que las marcas de histonas son cambios heredables de forma indirecta y por tanto objeto de estudio de la epigenética. Por otra parte, la tasa de error en la transmisión de los patrones de metilación es muy elevada y el patrón de metilación de las células hijas difiere bastante del de la célula madre de la que derivan si lo comparamos con la tasa de mutación en la replicación de la secuencia del DNA. Por lo tanto, la aplicación del término “heredable” al proceso de transmisión de los patrones de metilación según la definición clásica, es decir, desde el punto de vista de la tasa de mutación, es

discutible. En segundo lugar, el uso actual que se le está dando al término epigenética en áreas muy diversas de la biología molecular no tiene en cuenta la heredabilidad e incluye el estudio de marcas transitorias de la cromatina como la fosforilación de la variante de la histona H2A H2AX tras roturas de la doble cadena del DNA, o el estudio de los efectos sobre la transcripción de los RNA de interferencia (miRNA). Por lo tanto, se ha hecho necesaria una nueva definición de epigenética para abarcar todos los frentes de este campo de la biología molecular.

La regulación epigenética es esencial para el desarrollo normal de los organismos pluricelulares cuyas células son genéticamente idénticas pero estructural y funcionalmente heterogéneas. En mamíferos, la regulación epigenética está implicada en el silenciamiento de los genes imprintados, aquellos en los que sólo uno de los alelos se expresa dependiendo de si es de origen paterno o materno, y en la inactivación de uno de los cromosomas X en las hembras como mecanismo de compensación de dosis respecto a los machos (Lund y Van Lohuizen, 2004). Además, la epigenética está implicada en el silenciamiento de secuencias endoparásitas como los elementos transponibles en mamíferos, plantas y hongos.

A pesar de ser potencialmente heredables, las modificaciones epigenéticas son reversibles y se ven afectadas por las condiciones ambientales y por el envejecimiento (Jaenisch y Bird, 2003; Liu *et al.*, 2003). La importancia de los factores ambientales y su influencia sobre la epigenética se observa claramente en gemelos homocigóticos, en donde dos individuos, a pesar de ser genéticamente idénticos, presentan diferencias fenotípicas y diferente susceptibilidad al desarrollo de enfermedades en función de los hábitos de vida. Así, cuanto más difieren los hábitos de vida en términos de dieta, tabaquismo, consumo de fármacos, estrés, etc, más diferencias se observan en los niveles globales de metilación en parejas de gemelos homocigóticos (Fraga *et al.*, 2006).

La complejidad del control epigenético se observa en la gran cantidad y variedad de reacciones enzimáticas que tienen lugar en el proceso de regulación de la expresión génica así como en su interrelación y jerarquización. Estos mecanismos no son independientes sino que están íntimamente relacionados y coordinados entre sí existiendo un balance entre ellos para asegurar un control muy preciso de la transcripción génica así como de la replicación y la reparación del DNA. Por tanto, alteraciones en el correcto funcionamiento de la maquinaria epigenética pueden dar lugar a la aparición y progreso de diversas enfermedades como el cáncer.

2.1 Modificaciones de Histonas.

Se conocen una gran variedad de modificaciones postraduccionales que tienen lugar sobre residuos de los extremos N-terminales de las histonas y sobre algunos aminoácidos importantes en la interacción con el DNA presentes en la región globular de las histonas. Estas modificaciones son la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación y la ADP-ribosilación, y pueden darse en diferentes combinaciones en las histonas (figura 3).

La cantidad, variedad e interdependencia de modificaciones que se dan sobre las histonas ha dado lugar a la hipótesis de la existencia de un *código de histonas* (Strahl y Allis, 2000). Según esta hipótesis las diferentes modificaciones que se dan sobre las histonas, actuando de manera combinada o secuencial sobre una o más histonas, son reconocidas por diferentes proteínas que determinan las funciones específicas derivadas de dichas modificaciones. La hipótesis del código de histonas requiere la existencia de dos tipos de actividades bioquímicas, por un lado las enzimas que “escriben” el código, y por otro las que lo interpretan. Además, algunas modificaciones dependen de la existencia previa de otras, por ejemplo, la ubiquitinación de H2B en la lisina 123 es esencial para la metilación de la lisina 4 de H3 en *Saccharomyces cerevesiae* (Sun y Allis, 2002), y la

mutilación de la arginina 2 de la histona H3 impide la trimetilación de la lisina 4 de H3 (Kirmizis *et al.*, 2007; Guccione *et al.*, 2007).

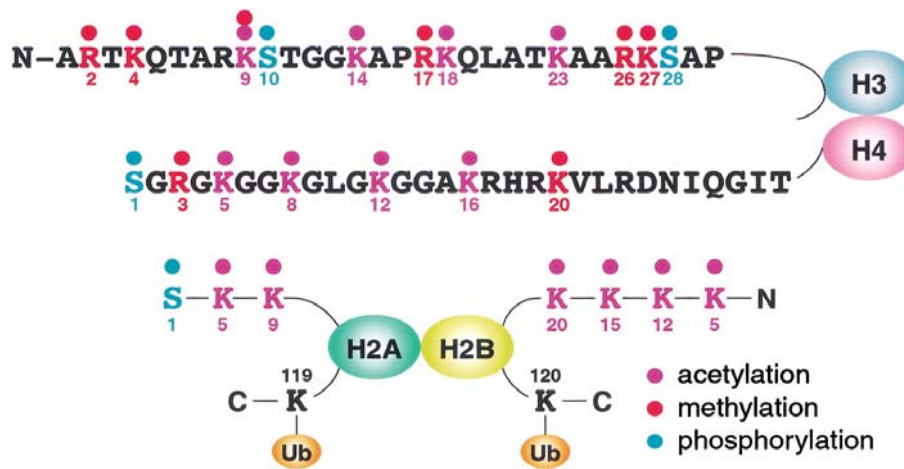


Figura 3. Principales residuos sobre los que tienen lugar las modificaciones postraduccionales en los extremos aminoterminales de las histonas (Zhang *et al.*, 2001).

Para comprender el estado transcripcional de un determinado gen hay que tener en cuenta no sólo las modificaciones puntuales sobre un residuo en una histona determinada sino también la combinación en que estas están presentes en los nucleosomas. Así, aunque algunas modificaciones como la acetilación se relaciona con ciertas funciones como la activación transcripcional y otras como la ubiquitinación se relacionan con represión, parece que cualquier modificación tiene el potencial de activar o reprimir la transcripción en función del contexto en que se halle. Por ejemplo, la metilación de la lisina 36 de H3 (H3K36) tiene un efecto positivo sobre la transcripción cuando se encuentra en regiones codificantes y un efecto negativo cuando se encuentra en regiones promotoras (Vakoc *et al.*, 2005).

Las marcas de las histonas determinan, además de funciones biológicas de la cromatina como la transcripción y la replicación, la localización y delimitación de los dominios estructurales de la cromatina en

el núcleo interfásico. Clásicamente se distingue entre dominios de eucromatina y heterocromatina, pudiendo ser esta última facultativa o constitutiva. La eucromatina es la estructura que adopta la cromatina en regiones funcionalmente activas y accesibles a las enzimas que regulan procesos como la replicación, la transcripción, la reparación, etc y que se asocia con marcas como di- y trimetilación de la lisina 4 de H3, mono-, di- y trimetilación de las lisinas 9 y 27 de H3 así como con la metilación de las lisinas 36 y 79 de la histona H3. La heterocromatina facultativa se corresponde con genes transcripcionalmente inactivos en un determinado linaje celular y se caracteriza por la presencia de marcas como la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 y la trimetilación de las lisinas 27 de H3 y 20 de H4. La heterocromatina constitutiva, que se encuentra en regiones con secuencias repetitivas como las presentes en telómeros y regiones centroméricas y subcentroméricas, y en secuencias endoparásitas, se caracteriza por la trimetilación de la lisina 9 de H3 y la monometilación de la lisina 27 de H3 (Luczak y Jagodzinski, 2006).

2.1.1 Acetilación.

La acetilación de las histonas se da sobre residuos de lisina. Esta modificación está implicada en el control transcripcional y en la reparación de los daños en el DNA (Qin y Parthun, 2002). En general, en las regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos se detectan niveles elevados de acetilación (Rho *et al.*, 2005). Por el contrario, la desacetilación de las histonas aumenta las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y el DNA, con carga negativa, lo que trae consigo una estructura más compacta de la cromatina y menos accesible a la maquinaria enzimática que regula sus funciones biológicas (Kouzarides, 2007). En las células eucariotas la mayor parte del genoma está constituido por cromatina transcripcionalmente inactiva cuyas histonas se encuentran hipoacetiladas.

En la mayoría de las especies los principales residuos donde se produce la acetilación son las lisinas 9, 14, 18 y 23 de la histona H3 y las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histona H4 (Bjerling *et al.*, 2002).

El estado de acetilación de un residuo determinado depende del balance entre dos actividades enzimáticas contrapuestas, la de las histona acetiltransferasas (HAT, *Histone Acetyltransferase*) y la de las histona desacetilasas (HDAC, *Histone Deacetylase*). Las HAT se clasifican en tres familias, GNAT, MYST y CBP/p300, en función de la homología de secuencia y de los motivos acetil-transferasa (Serner y Berger, 2000), y todas ellas transfieren un grupo acetilo de la Acetil Colina a la lisina. Algunas HAT llevan a cabo su actividad acetiltransferasa en el citoplasma de la célula mientras que otras lo hacen en el núcleo. La acetilación no se produce de forma exclusiva sobre las histonas. Otras proteínas son también sustrato de las HAT, en concreto factores de transcripción como p53, GATA-1, E2F, ER y varias proteínas reguladoras del ciclo celular y muchas de las proteínas del grupo HMG (*High-Mobility-Group*), que están implicadas en la activación transcripcional y en la estructura superior de la cromatina. El efecto de la acetilación sobre estas proteínas no histonas es variable. La acetilación incrementa la actividad de factores como p53 y GATA-1 mientras que inhibe la actividad transcripcional de otros factores como ACTR. (Yang, 2004; Kurdistani y Grunstein, 2003; Hasan y Hottiger, 2002; Marmorstein, 2001; Mai *et al.*, 2005). Así mismo, algunas HAT como PCAF, p300, Tip60, MORF, Hpa2 o Hpa3 pueden acetilarse a sí mismas regulando su actividad.

La desacetilación de los residuos de lisina la llevan a cabo las HDAC y da lugar generalmente a un estado de represión transcripcional. Existen 3 grupos de histona desacetilasas, las de tipo I, las de tipo II y las similares a Sir2, también llamadas HDAC de tipo III. Las HDAC de tipo I y las de tipo II se diferencian en la estructura primaria, tamaño y en la similitud a las desacetilasas de *Saccharomyces cerevesiae*, aunque poseen un dominio

catalítico idéntico. Las de clase I son homólogas a la proteína Rpd3 de *S. cerevisiae*. A este grupo pertenecen HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8 y HDAC11. Las de clase II, HDAC4-7, HDAC9, HDAC10, son homólogas a la proteína Hda1. Tanto las HDAC de tipo I como las de tipo II forman complejos *in vivo* aunque con diferentes grupos de proteínas y difieren en su localización celular y en el patrón de expresión. Todas las HDAC de tipo I excepto HDAC3 se localizan en el núcleo, sin embargo, las HDAC de tipo II se localizan en el núcleo o en el citoplasma dependiendo del estado de fosforilación de las mismas y de la interacción con la chaperona 14-3-3, que las retiene en el citoplasma (Yang y Seto, 2003). En cuanto al patrón de expresión tisular, las HDAC de tipo I se expresan en todos los tejidos mientras que las de tipo II presentan expresión específica de tejido. Al grupo HDAC III pertenecen aquellas desacetilasas de histonas similares a la proteína Sirtuina 2 (Sir2) de *S. cerevisiae* y se denominan SIRT1-7. Esta familia de desacetilasas se caracteriza por presentar un dominio catalítico diferente al que presentan los otros dos tipos de HDAC con un mecanismo de acción que requiere NAD^+ como sustrato. Ha sido descrito que SIRT1 desacetila también proteínas no histonas como p53 (Varizi, 2001).

Las HDAC existen en la célula como componentes de complejos multiproteicos como los complejos correpresores mSin3, N-CoR y SMRT (Glass y Rosenfeld, 2000). También aparecen formando complejos con enzimas de la maquinaria remodeladora de la cromatina como Mi-2, dando lugar a complejos bifuncionales como Mi-2/NuRD. También se ha descrito la interacción de las HDAC con factores de transcripción como E2f, Stat3, p53, retinoblastoma, NK-kB, TFIIE, etc (Lin *et al.*, 2006). Las HDAC no sólo desacetilan histonas por lo que están implicadas en numerosas rutas de señalización celular (Minucci y Pelicci, 2006).

2.1.2 Metilación.

La metilación tiene lugar sobre las cadenas laterales de lisinas (K) y argininas (R). A diferencia de lo que sucede con la acetilación de las lisinas, sobre un determinado residuo de lisina se puede dar mono-, di- o trimetilación, y el efecto de cada modificación depende tanto del residuo modificado como del grado de metilación. Este tipo de modificación postraducciona de las histonas ha sido relacionado tanto con la activación como con represión transcripcional, así como con la determinación de dominios estructurales de la cromatina como la heterocromatina (Peters y Schubeler, 2005; Sims *et al.*, 2003; Lachner y Jenuwein, 2003; Kouzarides, 2007).

Generalmente, la monometilación de las lisinas 27, 9 y 79 de la histona H3 y la de la lisina 5 de H2B está relacionada con activación génica (Barski *et al.*, 2007). Además, las regiones promotoras de los genes transcripcionalmente activos presentan altos niveles de trimetilación de la lisina 4 de H4, trimetilación de la lisina 36 de H3 (Bannister *et al.*, 2005; Barski *et al.*, 2007), monometilación de la lisina 20 de H4 (Schotta *et al.*, 2004; Talasz *et al.*, 2005; Vakoc *et al.*, 2006; Barski *et al.*, 2007), monometilación de la arginina 3 de H4 y de la arginina 2 de H3. Las zonas promotoras de genes transcripcionalmente inactivos se encuentran enriquecidas en modificaciones como trimetilación de la lisina 79 de H3, dimetilación y trimetilación de la lisina 27 de H3 y dimetilación y trimetilación de la lisina 9 de H3 (Barski *et al.*, 2007). La metilación de los residuos de lisina también está implicada en el mantenimiento de las regiones de heterocromatina ya que estas zonas se caracterizan por la presencia de niveles elevados de marcas como trimetilación de la lisina 20 de H4 y trimetilación de la lisina 9 de H3.

Las enzimas que llevan a cabo la metilación de las histonas son las Histona Metil Transferasas (HMT, *Histone Methyltransferase*) y utilizan S-adenosil-L-metionina (SAM) como donante del grupo metilo. Estas enzimas

son altamente específicas en cuanto al residuo sustrato de su reacción en comparación con las histona acetiltransferasas.

Todas las HMT de lisinas excepto Dot1L, que es similar a las metiltransferasas de argininas, comparten un dominio catalítico llamado SET. Este dominio no se encuentra limitado a proteínas HMT sino que aparece en muchas proteínas eucariotas así como en algunas proteínas presentes en procariotas. Las HMT de lisinas (KMT) se clasifican en función de la presencia o ausencia y la naturaleza de las secuencias que acompañan al dominio SET. Algunos ejemplos representativos de las familias más importantes de HMT son Suv39H1 (metilación de la lisina 9 de H3), SETDB1 (metilación de la lisina 9 de H3), SET1 (metilación de la lisina 4 de H3) EZH2 (metilación de la lisina 27 de H3) y RIZ (metilación de la lisina 9 de H3) (Cheng y Zhang, 2007).

La desmetilación de las lisinas la llevan a cabo las enzimas histona demetilasa. Existen dos tipos de dominio demetilasa de lisinas, el dominio LSD1 y el dominio JmjC. La primera enzima con actividad demetilasa de lisinas en ser caracterizada fue LSD1 (*Lysine Specific Demethylase 1*), cuyo sustrato más habitual es la lisina 4 de H3 (Shi *et al.* 2004), aunque se ha observado que cuando forma un complejo con el receptor de andrógenos (AR, *Androgen Receptor*) desmetila la lisina 9 de H3 activando la transcripción (Metzger *et al.*, 2005). El dominio JmjC fue identificado en ratón como una proteína con funciones importantes durante el desarrollo embrionario (Takeuchi *et al.*, 1995; Takeuchi, 1997). Más tarde se observó que una proteína con dominio JmjC, JHDM1A, tenía actividad histona demetilasa y que el dominio JmjC es el responsable de dicha actividad enzimática (Tsukada *et al.*, 2006). Desde entonces han sido caracterizadas otras proteínas con este dominio como JMJD2A/JHDM3A, JMJD2C/GASC1 o UTX (Agger *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2007).

La especificidad de residuo y de grado de metilación (mono-, di- o trimetilados) de todas estas proteínas con actividad demetilasa pone de manifiesto la importancia y complejidad del control preciso de la metilación de las lisinas (Shi y Whetstine, 2007).

Las enzimas encargadas de la metilación de las argininas se denominan PRMT (*Protein Arginine Methyltransferases*) y son reclutadas a los promotores por factores transcripcionales. Se han descrito siete PRMT, se sabe que todas emplean como sustrato de la reacción el grupo metilo de SAM pero no todas están completamente caracterizadas ni todas actúan sobre las histonas. Todavía no se han identificado enzimas con actividad demetilasa de residuos de arginina, sin embargo, la enzima PADI4 (*Peptidylarginine Deiminase-4*) puede convertir una arginina monometilada en citrulina liberando monometilamina (Denman, 2005) por lo que la deiminación tiene el potencial de antagonizar el efecto activador de la metilación de argininas. Sin embargo, la conversión de citrulina en arginina no ha sido descrita.

2.1.3 Fosforilación.

La fosforilación se lleva a cabo sobre residuos serina y treonina y se ha relacionado tanto con el control transcripcional como con procesos mitóticos. Así, la fosforilación se ha relacionado tanto con represión como con activación transcripcional y todo indica que una función u otra dependen del estado de acetilación de los residuos cercanos (Barrat *et al.*, 1994; Cheung *et al.*, 2000(b); Meriende *et al.*, 2001). La fosforilación de la serina 10 de H3, llevada a cabo por las enzimas MSK1/2 y RSK2, está relacionada con la condensación mitótica de la cromatina (Gurley *et al.*, 1973; Hendzel *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1999) y con la regulación transcripcional, sobretudo en la respuesta rápida de algunos genes como *c-jun*, *c-fos* y *c-myc* (Mahadevan *et al.*, 1991; Thomson *et al.*, 1999; Chadee *et al.*, 1999).

2.1.4 Ubiquitinación.

La ubiquitinación se produce sobre residuos de lisina. La ubiquitinación de las histonas H2A en la lisina 119 y H2B en la lisina 120 afecta al 10-15% de las histonas en la mayoría de las células eucariotas (Sun y Allis, 2002). La ubiquitinación de H2AK119 es llevada a cabo por la proteína Bmi/Ring1A (parte del complejo *Polycomb*) y se asocia con represión transcripcional (Wang *et al.*, 2006) mientras que la ubiquitinación de H2BK120, mediada por RNF20/RNF40 y UbcH6 (Zhu *et al.*, 2005), se asocia con activación transcripcional y con la elongación transcripcional mediada por la chaperona de histonas FACT (Pavri *et al.*, 2006).

La ubiquitinación de las histonas se relaciona también con la meiosis, la espermatogénesis (Baarends *et al.*, 1999, 2005) y la reparación del DNA. No parece que haya una señal para su degradación (Wu *et al.*, 1981; Seale, 1981) aunque en levadura se han identificado enzimas que antagonizan la ubiquitinación de la lisina 123 de la histona H2B (Emre *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2005). Tampoco se ha podido relacionar la ubiquitinación de H2A y H2B con ningún cambio en la estructura del nucleosoma (Kleinschmidt y Martinson, 1981; Davies y Lindsey, 1994; Jason *et al.*, 2001), por lo que parece que estas modificaciones pueden actuar como señales de reconocimiento de factores reguladores y/o actuar sinérgicamente con otras modificaciones postraduccionales de las histonas (Li *et al.*, 1993).

2.1.5 Sumoilación.

SUMO es un péptido relacionado con la ubiquitina y como ella puede ser unido covalentemente a residuos de lisina de las histonas. Se ha demostrado que esta modificación tiene lugar sobre las 4 histonas que forman el octámero y han sido encontrados sitios específicos de sumoilación en H4, H2A y H2B (Nathan *et al.*, 2006). En levaduras se ha observado que la sumoilación antagoniza tanto la acetilación como la

ubiquitinación que se producen sobre el mismo residuo de lisina, por lo que esta marca se relaciona con la represión de la transcripción (Nathan *et al.*, 2006).

2.1.6 Ribosilación.

Las lisinas pueden ser mono- o poli-ribosiladas con ADP, lo que da lugar a la clasificación de las enzimas que llevan a cabo esta modificación en dos clases, MART (*Mono-ADP-ribosyltransferase*) y PARP (*Poly-ADP-ribosepolymerase*) (Hassa *et al.*, 2006). Aunque el descubrimiento de que la familia Sir2 de proteínas con actividad HDAC tiene niveles bajos de esta actividad hace pensar que esta familia podría representar un tercer grupo de enzimas ribosilantes. Esta modificación parece relacionada con transcripción génica pero parece necesario que se haya producido una rotura en el DNA, así, las roturas de doble hebra mediadas por la topoisomerasa II b activan la enzima PARP-1 (Ju *et al.*, 2006).

2.1.7 Isomerización de la prolina.

Los aminoácidos que forman parte de una proteína pueden tener dos conformaciones, *cis* o *trans*, en función del ángulo que forma el enlace peptídico con el aminoácido adyacente. Una de las últimas modificaciones encontradas que tienen lugar sobre las histonas es la isomerización de la prolina. En levadura ha sido caracterizada una proteína llamada FPR4 que puede isomerizar prolinas que se encuentran en el extremo N-terminal de H3 (Nelson *et al.*, 2006). La isomerización de la prolina 38 de H3 regula los niveles de metilación de la lisina 36 de H3 ya que la isomerización parece necesaria para el reconocimiento de la lisina por parte de metiltransferasas y demetilases (Chen *et al.*, 2006).

2.2 Complejos remodeladores de la cromatina.

Los complejos que modifican la cromatina añadiendo o eliminando modificaciones covalentes en las histonas actúan en cooperación con complejos remodeladores que hacen posible el acceso al DNA nucleosomal alterando la estructura, composición y posicionamiento de los nucleosomas. Cada complejo remodelador afecta a la estructura del nucleosoma de una manera distinta, aunque todos ellos necesitan hidrólisis de ATP para llevar a cabo su función.

Los organismos eucariotas tienen al menos 5 familias de complejos remodeladores de la cromatina denominadas SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/CHD, INO80 y SWR1 (Saha *et al.*, 2006) que se diferencian en los dominios estructurales presentes en la subunidad ATPasa. La subunidad con actividad ATPasa está embebida dentro de un complejo multiproteico del que forman parte otras enzimas que llevan a cabo desplazamientos del nucleosoma, intercambio de histonas o incluso eliminación completa del octámero de histonas del nucleosoma (Hogan y Varga-Weisz, 2007).

Algunos complejos tienen una doble actividad catalítica remodeladora y modificadora de histonas. Por ejemplo, el complejo Mi-2/NuRD contiene las histona desacetilasas HDAC1 y HDAC2 y la subunidad catalítica con actividad remodelante Mi-2 (Vignali *et al.*, 2000). Esto pone de manifiesto la interrelación entre los diferentes mecanismos de regulación epigenética que tienen lugar sobre la cromatina.

Todos estos complejos reconocen histonas modificadas a través de dominios presentes en alguna de sus subunidades. Existen dos dominios implicados en el reconocimiento de las histonas modificadas covalentemente, el bromodominio y el cromodominio. El bromodominio está implicado en el reconocimiento de lisinas acetiladas, y por ejemplo, en el complejo SWI/SNF, la subunidad HBRM contiene dicho dominio. Por su parte, el cromodominio se une por un lado al DNA y por otro a la histona

H3 metilada y está presente en proteínas que forman parte de complejos de la familia CHD entre otros (Marfella e Imbalzano, 2007).

Los complejos remodeladores dependientes de ATP desempeñan un papel fundamental en la expresión génica regulando el acceso de la maquinaria de la transcripción a la cromatina. Regulan también la reparación y la replicación del DNA. La importancia de estos complejos se pone de manifiesto en las patologías que provoca la regulación incorrecta de su funcionamiento (Cho *et al.*, 2004). Además, algunas subunidades del complejo SWI/SNF son supresoras de tumores o son requeridas para la actividad de otros genes supresores de tumores (Sansam y Roberts, 2006).

2.3 Metilación del DNA.

La metilación del DNA es una modificación química que consiste en la unión covalente de un grupo metilo al carbono 5' de las citosinas, aunque en organismos procariotas también se ha observado sobre el carbono 5' de las adeninas.

El grado de metilación y la función de esta modificación son distintos en cada tipo de organismo. En procariotas la metilación apareció posiblemente como mecanismo de defensa de las bacterias frente a la colonización por parte de genomas invasores. Por su parte, en organismos eucariotas la metilación del DNA es muy heterogénea. En plantas y hongos filamentosos la metilación del DNA se produce casi exclusivamente en transposones y secuencias repetitivas sobre las citosinas en el contexto de las secuencias simétricas CpG y CpNpG (donde N es cualquier nucleótido) o asimétricas CpHpH (donde H es C, A o T). Sin embargo, en animales la metilación se da exclusivamente en el contexto del dinucleótido CpG. En invertebrados la metilación aparece en forma de parches a lo largo de todo el genoma y no necesariamente sobre elementos repetitivos o genes mientras que en animales vertebrados el genoma aparece globalmente metilado.

La metilación de secuencias endoparásiticas previene a la célula de la activación de genes que pueden desencadenar un tumor, además, la metilación de secuencias repetitivas y transposones evita que salten de su posición y se inserten en otras protegiendo por tanto la integridad de los cromosomas.

En mamíferos la metilación del DNA está implicada en el silenciamiento de genes imprintados, en el silenciamiento de uno de los cromosomas X en hembras, en el silenciamiento de secuencias endoparásiticas y en la estabilidad cromosómica. El *imprinting* es el mecanismo que determina la expresión o represión de determinados genes como Igf2 y H19 en función de su origen parental, sólo uno de los alelos se expresa mientras que el otro permanece silenciado por metilación densa del promotor. La expresión de uno solo de los alelos garantiza la dosis exacta en la célula de los genes regulados a través de este mecanismo. En cuanto al cromosoma X, el *imprinting* es el mecanismo de compensación de dosis en hembras respecto a los machos, ya que tiene lugar la condensación e inactivación de uno de los cromosomas de forma aleatoria en cada célula durante las primeras fases del desarrollo. El mecanismo de inactivación consiste en la heterocromatinización del cromosoma a partir de un punto llamado XIC (*X-Inactivation Centre*) desde el que se expanden a lo largo de cromosoma las marcas de heterocromatina (Straub y Becker, 2007).

En el genoma humano, la proporción del dinucleótido CpG es menor de la esperada estadísticamente y su distribución no es aleatoria, ya que se concentra en regiones llamadas islas CpG que se encuentran en las zonas promotoras de casi el 60% de los genes (Gratier-Gardien y Frommer 1987; Bird *et al.*, 1985). En células humanas normales la mayor parte de las citosinas del dinucleótido CpG se encuentran metiladas cuando aparecen dispersas en el genoma en regiones que no corresponden con islas CpG y que se encuentran mayoritariamente en secuencias repetitivas. Esta metilación está implicada en el mantenimiento de la estabilidad

cromosómica, en la prevención de translocaciones y en el silenciamiento de secuencias endoparásitas. Sin embargo, las islas CpG generalmente no contienen 5-metilcitosina (Bird, 2002), sólo aquellas de los genes imprintados y otros genes silenciados por metilación, como los que se expresan exclusivamente durante el desarrollo embrionario (Oct-4, Nanog, etc) (Hattori *et al.*, 2007), se encuentran metiladas.

Los patrones de metilación se establecen durante el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo preimplantacional se produce una desmetilación pasiva del DNA y una reorganización de las marcas de histonas seguida de una metilación *de novo* del DNA tras la implantación del embrión que determina el patrón epigenético del nuevo individuo. Esta reprogramación epigenética parece ser necesaria para la totipotencia celular, para la expresión génica y para el desarrollo temprano de los linajes celulares en el embrión (Morgan *et al.*, 2006).

2.3.1 DNMT (DNA Methyltransferases).

La metilación del DNA la llevan a cabo unas enzimas llamadas DNMTs (*DNA Methyltransferases*) que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (SAM) hasta la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina (figura 4).

La familia DNMT está formada por 5 proteínas, DNMT1, DNMT2, DNMT3a y DNMT3b, y una enzima similar a DNMT3 llamado DNMT3L (*DNMT3-like*), aunque sólo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b tienen actividad DNA metiltransferasa. Todas las DNMTs comparten un dominio DNA-(citosina-5-) metiltransferasa compuesto por 10 motivos estructurales con una secuencia muy conservada. La DNMT3L carece de 4 de estos motivos y la homología de otros 3 no es completa (Aapola *et al.*, 2002).

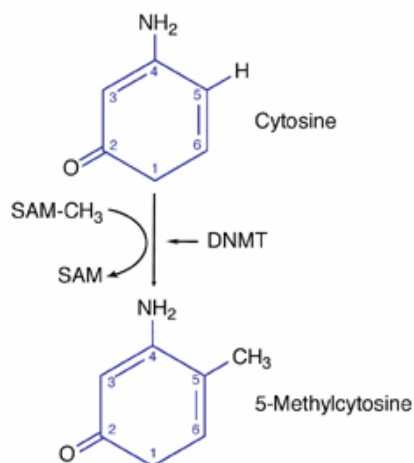


Figura 4. Mecanismo de metilación del anillo pirimidínico de la citosina.

Cada DNMT desempeña una función determinada. DNMT1 se ha relacionado con la metilación de mantenimiento que tiene lugar tras cada ronda de replicación para asegurar un patrón de metilación idéntico en ambas células hijas, mientras que DNMT3a y DNMT3b se relacionan con la metilación *de novo* que tiene lugar durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, no podemos descartar funciones redundantes ya que la sobre-expresión de DNMT1 da lugar a metilación *de novo* en líneas celulares (Vertino *et al.*, 1996). Los ratones *knock out* para DNMT1 y DNMT3b son letales embrionarios mientras que los ratones *knock out* para DNMT3a mueren cuatro semanas después del parto (Li, 2002).

DNMT2 muestra una débil actividad DNA metiltransferasa *in vitro* (Hermann *et al.*, 2003) pero la eliminación de esta proteína no afecta los niveles globales de metilación en células madre embrionarias por lo que esta enzima no parece estar involucrada en la determinación de los patrones de metilación del DNA (Okano *et al.*, 1998). La actividad metiltransferasa de DNMT2 parece involucrada en la metilación de tRNA. En concreto, se ha demostrado que DNMT2 metila el tRNA encargado del transporte de ácido aspártico (Goll *et al.*, 2006).

DNMT3L carece de actividad metiltransferasa pero está directamente relacionada con la represión epigenética al reclutar actividad histona desacetilasa a promotores metilados (Aapola *et al.*, 2002; Deplus *et al.*, 2002). Además, DNMT3L induce la actividad metiltransferasa de DNMT3a (Chen *et al.*, 2002) y contiene un dominio rico en cisteína que reconoce el extremo N-terminal de la histona H3 cuando esta carece de metilación en la lisina 4. Ha sido demostrado que DNMT3L induce la metilación *de novo* del DNA de las regiones del genoma que carecen de metilación de la lisina 4 de H3 mediante su capacidad de unión a DNMT3a por un lado (Jia *et al.*, 2007), y la unión a la histona H3 no metilada en la lisina 4 por otro (Ooi *et al.*, 2007).

La desmetilación del DNA puede ser activa o pasiva. En el mecanismo pasivo, DNMT1, encargada de la metilación de mantenimiento, no llevaría a cabo su función tras la replicación del DNA ya sea por estar reclutada por algún cofactor o por la imposibilidad de unirse al DNA por la presencia de marcas en las histonas como la acetilación. El mecanismo activo de desmetilación del DNA no ha podido asociarse a ninguna actividad enzimática. Se cree que una enzima glicosilasa elimina el nucleósido 5m-citosina de la cadena de DNA tras lo que una enzima endonucleasa repara dicha escisión introduciendo una citosina no metilada. Recientemente se ha publicado que Gadd45a (*Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein 45 alpha*), una proteína nuclear relacionada con la estabilidad genómica, reparación del DNA y supresión del crecimiento celular, juega un papel fundamental en el mecanismo activo de desmetilación y que este depende del reclutamiento de la endonucleasa XPG (Barreto *et al.*, 2007). Por tanto, Gadd45a promovería la reparación del DNA, dando lugar a la eliminación de las citosinas metiladas y a su remplazamiento por citosinas no metiladas al reclutar XPG.

2.3.2 Proteínas de unión a DNA metilado: familia MBD.

La información contenida en la metilación de la citosina es interpretada por una familia de proteínas que comparten un dominio de unión a DNA metilado llamado *Methyl-CpG Binding Domain* (MBD).

La estructura del dominio MBD unido al DNA metilado ha sido resuelta utilizando el dominio MBD de la proteína MBD1 (Ohki *et al.*, 2001) (figura 5A). El dominio MBD se pliega en forma de estructura α/β tipo sándwich que contiene una capa de lámina β girada seguida de otra capa formada por la hélice $\alpha 1$ y un bucle (*hairpin loop*) en el extremo C-terminal. Estas dos capas son anfipáticas, con la hélice $\alpha 1$ y la lámina β en paralelo con las caras hidrofóbicas pegadas. La lámina β está compuesta por cuatro cadenas, dos cadenas más largas internas ($\beta 2$ y $\beta 3$) y dos cadenas externas más cortas ($\beta 1$ y $\beta 4$). La zona de la lámina β que sobresale debido a la mayor longitud de las dos cadenas internas está embebida en el DNA y junto al bucle L1, que une $\beta 2$ y $\beta 3$, forma la zona de unión al DNA. El reconocimiento de los grupos metilo de la secuencia CpG en los sitios de metilación se debe a 5 residuos altamente conservados, Val-20, Arg-22, Tyr-34, Arg-44 y Ser-45, que forman una zona hidrofóbica donde se une el grupo metilo (figura 5B).

En mamíferos, la familia de proteínas MBD está formada por 5 miembros: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4 (figura 6). En general estas proteínas se localizan en zonas de la cromatina de metilación densa y están implicadas, a excepción de MBD4 (cuya función está relacionada con la reparación del DNA), en el silenciamiento de genes imprintados y de secuencias endoparásitas, en la estabilidad cromosómica y en la represión transcripcional a través del reclutamiento de actividades modificadoras y remodeladoras de la cromatina a secuencias de DNA metiladas. En concreto, han sido encontradas unidas a la cromatina pericentromérica de ratón donde se encuentra la fracción más grande de DNA metilado llamada

major satellite (Lewis *et al.*, 1992), y al promotor de genes imprintados, en los que las MBD aparecen unidas al alelo metilado (Fournier *et al.*, 2002).

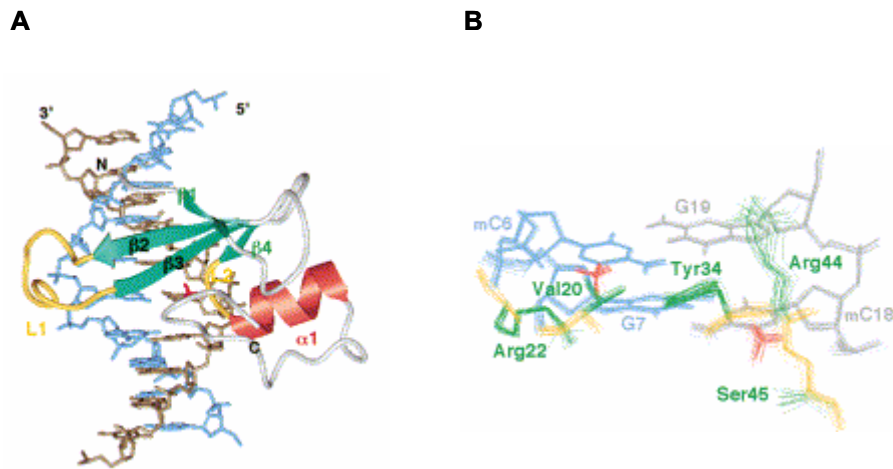


Figura 5. A) Estructura del dominio MBD de MBD1 unido al DNA. B) Posición de los cinco residuos críticos en el reconocimiento del grupo metilo. (Ohki *et al.*, 2001).

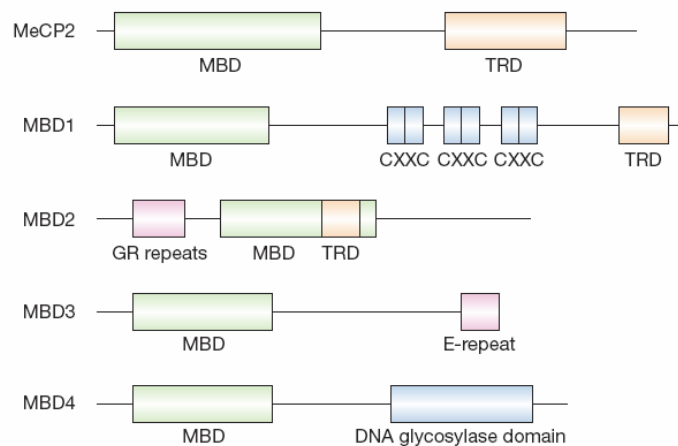


Figura 6. Representación esquemática de los miembros de la familia de proteínas MBD (Sansom, Maddison y Clarke, 2007).

La primera proteína caracterizada de esta familia fue MeCP2 (Nan *et al.*, 1997). MeCP2 tiene un dominio MBD de unos 70 aminoácidos en su

extremo N-terminal con capacidad de unión a DNA metilado. La secuencia de aminoácidos de este dominio no contiene ningún elemento clásico de unión a DNA por lo que constituye por sí mismo un nuevo dominio de unión. El resto de proteínas que forman la familia MBD (MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4) fueron identificadas en bases de datos utilizando como criterio de búsqueda este dominio de unión a DNA metilado caracterizado en MeCP2. La similitud en el resto de la secuencia aminoacídica de las proteínas de esta familia es muy baja excepto la que se da entre MBD2 y MBD3, que presentan un 65% de similitud en toda la secuencia.

Existen además cuatro proteínas con un dominio homólogo al MBD de MeCP2 encontradas por búsqueda bioinformática en bases de datos: BAZ2A/TIP5, BAZ2B, CLLD8 y SETDB1 (Roloff *et al.*, 2003), de las que se sabe muy poco. Sólo se sabe que BAZ2A/TIP5 forma parte del complejo remodelador NoRC, implicado en la represión transcripcional de genes ribosómicos dependiente de metilación (Santoro y Grummt, 2001).

En organismos invertebrados existe un único gen que codifica una proteína denominada MBD2/3. Este gen es homólogo de MBD2 y MBD3 y se piensa que podría ser el gen del que derivan el resto de genes que codifican las distintas proteínas MBD que se encuentran en vertebrados. Los genes que codifican MBD2 y MBD3 tienen la misma estructura y se diferencian sólo en el tamaño de las secuencias intrónicas. Por tanto, parece que en los vertebrados se ha producido una duplicación del gen MBD2/3 que ha dado lugar a los genes MBD2 y MBD3 (Hendrich y Tweedie, 2003) así como al resto de proteínas MBD.

En plantas, la metilación del DNA también es interpretada por proteínas MBD. En este caso, el número de proteínas MBD es muy elevado y se clasifican en 8 subgrupos en función del grado de similitud del dominio MBD (Grafi *et al.*, 2007). Sólo algunos miembros de los subgrupos IV y VI, donde se agrupan las que presentan una mayor similitud con las proteínas MBD humanas, tienen dominios de unión a DNA metilado funcionales. En

el resto de proteínas MBD de plantas el dominio de unión a DNA metilado no es funcional. Las plantas monocotiledóneas carecen de los subgrupos IV y VI, por lo que la metilación del DNA en este tipo de plantas debe de estar regulado por otras proteínas capaces de reconocer DNA metilado como la proteína VIM1, implicada en la formación de la heterocromatina centromérica (Woo *et al.*, 2007).

2.3.2.1 MeCP2.

El gen que codifica MeCP2, el miembro fundador de la familia MBD, se encuentra en el cromosoma X. Está compuesto por 4 exones y da lugar a dos isoformas (MeCP2 β y MeCP2 α) por *splicing* alternativo en función de la presencia o ausencia del exón 2. MeCP2 β fue la primera isoforma caracterizada a pesar de ser minoritaria en todos los tejidos tanto en ratón como en humano (Kriaucionis y Bird, 2004).

MeCP2 es un péptido de 50 kDa que contiene el dominio de unión a DNA metilado en el extremo N-terminal y un dominio de represión transcripcional, TRD (*Transcriptional Repression Domain*), cerca del extremo C-terminal (Hendrich y Bird, 1998). El TRD incluye una señal de localización nuclear (Nan *et al.*, 1997). En la región C-terminal aparecen secuencias repetitivas muy similares a nivel de secuencia a las que aparecen en los miembros de la familia *Fork Head* de represores transcripcionales (Vacca *et al.*, 2001). La delección de 60 aminoácidos de la región C-terminal que incluya estas repetitivas compromete la capacidad de MeCP2 para reconocer citosinas metiladas en la superficie de los nucleosomas (Chandler *et al.*, 1999). MeCP2 contiene además motivos que han sido encontrados en proteínas que se unen al DNA en secuencias ricas en las bases A/T ([A/T] mayor o igual que 4) (Lewis *et al.*, 1992; Nan *et al.*, 1993). Estas secuencias ricas en bases de Adenina y Timina se han encontrado en regiones diana conocidas de MeCP2 como en el promotor del gen BDNF (Klose *et al.*,

2005), y su presencia parece esencial para una unión eficiente de MeCP2 al DNA metilado.

Un solo dinucleótido CpG metilado es suficiente para la unión de MeCP2 al DNA y reprimir la transcripción génica en regiones situadas a cientos de pares de bases de distancia del punto de unión (Nan *et al.*, 1997). MeCP2 se ha encontrado unida a zonas cromosómicas donde la metilación del DNA es muy densa. Concretamente, en ratones aparece unida a los satélites pericentroméricos que se encuentran altamente metilados, y pierde su localización en ratones que carecen de un gen DNMT funcional, indicando que MeCP2 se une de manera preferente a secuencias metiladas (Nan *et al.*, 1996).

La capacidad represora de la transcripción génica de secuencias metiladas por parte de MeCP2 está mediada por el reclutamiento de complejos proteicos con actividad remodeladora de la cromatina con los que interacciona. El dominio TRD se une al complejo correpresor Sin3A que contiene las histona desacetilasas HDAC1 y HDAC2. El mecanismo represor de MeCP2 parece estar mediado no sólo por el reclutamiento de actividad desacetilasa a las secuencias metiladas, sino también por el reclutamiento de enzimas con actividad histona metiltransferasa (HMT) específica para la lisina 9 de la histona H3 (Fuks *et al.*, 2003). Esto explicaría por qué el tratamiento de las células con TSA (Tricostatina A), una droga que inhibe las HDAC, no consigue contrarrestar el efecto represor de la unión de MeCP2 a DNA metilado (Fuks *et al.*, 2003).

Además de en la represión transcripcional, MeCP2 parece estar implicada en la regulación del *splicing* alternativo de mRNA, ya que por estudios de inmunoprecipitación se ha visto asociada con la proteína YB-1 (*Y box-binding protein 1*), una proteína reguladora de muchos pasos del procesamiento de los RNA mensajeros como el *splicing* alternativo (Young *et al.*, 2005).

Aunque cabría esperar una localización exclusivamente nuclear, pues se trata de una proteína de unión a DNA, se ha descrito que MeCP2 se encuentra tanto en el núcleo como en el citosol de células de rata durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, siendo translocada al núcleo durante la diferenciación neuronal. La localización celular de MeCP2 parece depender de modificaciones postraduccionales, así, la forma citosólica de MeCP2 está fosforilada en residuos de serina y treonina mientras que la forma nuclear no lo está. Además, MeCP2 se encuentra SUMOilada tanto en el núcleo como en el citosol (Kunio *et al.*, 2007).

Mutaciones en los dominios MBD y TRD de MeCP2 dan lugar a una enfermedad neurodegenerativa llamada Síndrome de Rett. Esta enfermedad afecta mayoritariamente a mujeres al encontrarse el gen que codifica MeCP2 en el cromosoma X y se caracteriza por un retraso mental grave acompañado de autismo, microcefalia, hiperventilación intermitente, movimientos muy característicos de las manos y otros síntomas que aparecen entre los 6-18 meses de edad tras un desarrollo inicial aparentemente normal (Amir *et al.*, 1999). Los ratones deficientes en MeCP2 son viables pero muestran síntomas del síndrome del Rett como problemas en la coordinación motora de las patas.

2.3.2.2 MBD1.

MBD1 es una proteína de 55 kDa codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 18. MBD1 se encuentra unida de forma dispersa a los cromosomas, aunque se observa cierta concentración en las regiones pericentroméricas. La proteína MBD1 contiene un dominio MBD y un dominio TRD además de regiones ricas en cisteína llamadas CxxC. Existen varias isoformas generadas por *splicing* alternativo que se diferencian en el número de regiones ricas en cisteína CxxC (CxxC1, CxxC2 y CxxC3) que se encontraron inicialmente en las proteínas DNMT. Estos motivos CxxC permiten la unión de MBD1 a DNA no metilado (Jørgensen *et al.*, 2004), y

en la región C-terminal (figura 7). Se conocen seis isoformas de MBD1 llamadas PCM1 (MBD1 Δ 6,15b), MBD1v1 (MBD1 Δ 15b), MBD1v2 (MBD1 Δ 9,12), MBD1v3 (MBD1 Δ 10,15b), MBD1v4 (MBD1 Δ 10,12,15b), MBD1v6 (MBD1 Δ 12,15b) (entre paréntesis se especifican los exones de los que carece cada isoforma) y una séptima isoforma que ha sido caracterizada durante la realización de esta tesis y a la que se ha llamado MBD1 Δ 10 por carecer del exón 10.

Las variantes MBD1v1, MBD1v2 y MBD1v6 contienen los tres motivos CxxC diferenciándose en el dominio TRD (las variantes MBD1v2 y MBD1v6 carecen de la parte del dominio TRD correspondiente al exón 12) y en el exón 15b, ausente en las variantes MBD1v1 y MBD1v6. Las variantes MBD1v3 y MBD1v4 tienen los dominios CxxC1 y CxxC2, pero mientras que la variante MBD1v3 carece del exón 15b la variante MBD1v4 carece del exón 12, parte del dominio TRD. La variante MBD1 Δ 10 descrita en este trabajo tiene también los dominios CxxC1 y CxxC2. Por último, PCM1 (la primera isoforma de MBD1 descrita) tiene los dominios CxxC2 y CxxC3 y carece del exón 15b.

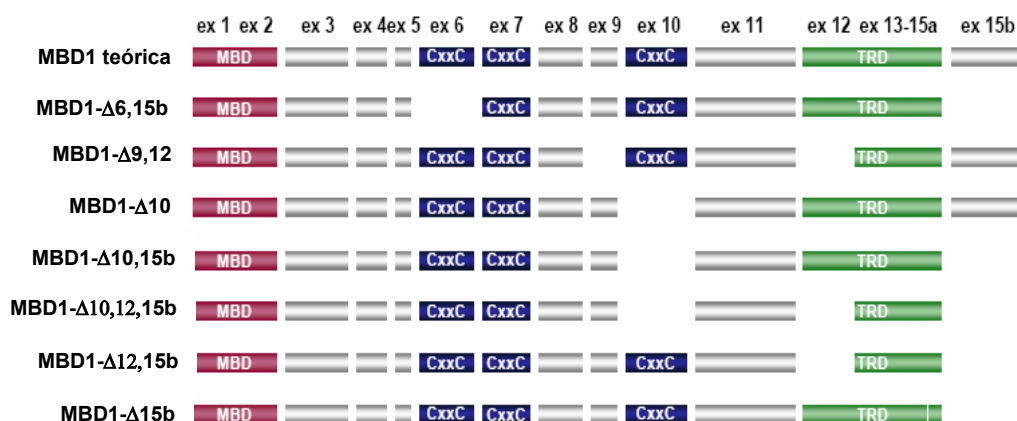


Figura 7. Esquema representativo de las siete isoformas de la proteína MBD1 generadas por *splicing* alternativo del gen MBD1.

La isoforma MBD1v1 reprime la transcripción de genes cuyos promotores se encuentran tanto metilados como no metilados cuando se transfecta en células de mamífero. Sin embargo, la isoforma MBD1v3 inhibe la transcripción de genes cuyos promotores están densamente metilados pero no la de aquellos cuyos promotores no están metilados. Esto indica que el dominio CxxC3 es el responsable de la unión a secuencias no metiladas y lo que permite la represión de genes no metilados (Fujita *et al.*, 2003).

MBD1 contiene además un dominio de represión transcripcional (TRD) en el extremo C-terminal que interacciona con el factor MCAF (*MBD1-containing Chromatin Associated Factor*). MCAF es una proteína que contiene dos dominios que le permiten interaccionar por un lado con MBD1 y por otro con Sp1 (un activador transcripcional), por lo que MCAF actúa como activador o represor transcripcional en función de la proteína con la que interaccione. Cuando MCAF es reclutado por MBD1 a promotores metilados inhibe la formación del complejo de preiniciación transcripcional (Fujita *et al.*, 2003).

La actividad represora de MBD1 parece estar mediada por la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (mK9H3) a través del reclutamiento de la histona metiltransferasa SETDB1 (Ng *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2003(a); Sarraf y Stancheva, 2004). También se ha descrito la interacción de MBD1 con Suv39h1, otra proteína con actividad HMT sobre la lisina 9 de la histona H3 (Fujita *et al.*, 2003(b)). Sin embargo, el tratamiento con TSA revierte la represión transcripcional mediada por MBD1, lo que indica que en este proceso debe de estar implicado un mecanismo dependiente del estado de acetilación de las histonas. No obstante, no se ha encontrado interacción entre MBD1 y HDAC1 o HDAC2, por lo que el mecanismo por el que tiene lugar la desacetilación de histonas dependiente de MBD1 podría diferir del de MeCP2 o MBD2 (Ng *et al.*, 2000).

Además, MBD1 interacciona con las proteínas del complejo Polycomb (PcG) PCR1, Ring1b y hPc2, por lo que está implicada también en el silenciamiento transcripcional de los genes HOX (Sakamoto *et al.*, 2007).

La actividad de MBD1 está regulada por la sumoilación de 2 residuos conservados alrededor de las lisinas K450 y K489 del extremo C-terminal llevada a cabo por la proteína SUMO1. La Sumoilación de MBD1 impide su interacción con el complejo SETDB1 (Lyst *et al.*, 2006) con lo que se impide la represión mediada por la metilación de las lisinas.

Los ratones que carecen de MBD1 no presentan problemas durante el desarrollo y llevan una vida aparentemente normal. Sin embargo, las células neuronales pluripotenciales presentan menor diferenciación neuronal y mayor inestabilidad cromosómica (Zhao *et al.*, 2003).

2.3.2.3 MBD2.

La proteína MBD2 está codificada por un gen del cromosoma 18. Existen dos isoformas de la proteína MBD2 con diferente inicio de traducción, MBD2a, de 43,5 kDa y MBD2b, de 29,1 kDa. Se ha publicado que MBD2b tiene la capacidad de desmetilar el DNA mediante la hidrólisis de la 5-metilcitosina, lo que daría lugar a citosina y metanol (Bhattacharya *et al.*, 1999), pero estos resultados no han podido ser reproducidos, y la bioquímica de la reacción enzimática que describen no parece viable (Wolffe, Jones y Wade, 1999).

Estudios *in vitro* muestran que MBD2 es el miembro de la familia MBD con mayor afinidad por DNA metilado (Fraga *et al.*, 2003). MBD2 forma parte del complejo MeCP1 junto con Mi-2/NuRD (Ng *et al.*, 1999), un complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP que cuenta entre sus componentes con otra proteína MBD, MBD3, y las histona desacetilasas HDAC1 y HDAC2. El complejo se forma cuando MBD2 recluta Mi-2/NuRD a secuencias de DNA metiladas.

Parece que MBD2 es reclutada a secuencias específicas mediante su interacción con una proteína con 7 dedos de zinc llamada MIZF. Esta proteína es un correpresor transcripcional dependiente de metilación que recluta MBD2 y actividad HDAC al DNA metilado en el contexto de la secuencia CGGACGTT (Sekimata *et al.*, 2001; Sekimata y Homma, 2004).

MBD2 está implicada en el silenciamiento dependiente de metilación del gen *Xist*, que juega un papel fundamental en el mecanismo de compensación de dosis del cromosoma X en las hembras de mamíferos. El producto de este gen es un RNA no codificante que se dispone a lo largo del cromosoma X que permanece inactivo durante la vida del individuo. El promotor del gen *Xist* del cromosoma activo está densamente metilado y no se transcribe, mientras que el del cromosoma inactivo no lo está y es el que se transcribe. MBD2 media el reclutamiento de complejos histona desacetilasa al promotor del gen *Xist* que permanece inactivo (Barr *et al.*, 2007).

Los ratones deficientes en MBD2 no presentan defectos graves durante el desarrollo embrionario y son aparentemente normales cuando alcanzan la edad adulta. Sin embargo, las hembras MBD2^{-/-} presentan comportamientos atípicos con las crías tras el parto, desatendiendo a la camada (Hendrich *et al.*, 2001). Además, la pérdida de MBD2 se asocia con cambios significativos en la cantidad de transcritos de ciertas citoquinas importantes en el proceso de diferenciación de los linfocitos T (Hutchins *et al.*, 2002). Sin embargo, en ratones con fondo Apc^(Min/+) (modelo murino de neoplasias intestinales) la deficiencia de MBD2 reduce la tumorigénesis intestinal hasta 10 veces y los adenomas desarrollados por los ratones Apc^(Min/+) MBD2^{-/-} están más localizados que los desarrollados por los ratones Apc^(Min/+) MBD2^{+/+} (Sansom *et al.*, 2003).

2.3.2.4 MBD3.

El gen que codifica la proteína MBD3 se encuentra en el cromosoma 19. MBD3 tiene también 2 variantes de *splicing* dando lugar a proteínas de diferentes tamaños. La más abundante tiene un peso molecular de 32 kDa y es muy similar a la proteína MBD2b (80% similar, 72% idéntico). La otra variante contiene una inserción de 20 aminoácidos en el dominio MBD, siendo el resto de la secuencia idéntica a la de la variante corta.

En mamíferos, MBD3 ha perdido la capacidad de unión a DNA metilado, no así en *Xenopus*, donde una de las isoformas conserva dicha capacidad. La pérdida de esta capacidad de unión a DNA metilado en mamíferos se debe a dos variaciones en la cadena $\beta 3$ del dominio MBD correspondientes a dos aminoácidos altamente conservados entre el resto de proteínas MBD, tanto en mamíferos como en otros organismos. Una de las variaciones es un cambio de tirosina por fenilalanina en la cadena $\beta 3$, la cual compromete la capacidad de unión a DNA metilado cuando se sustituye en MeCP2 y MBD1 (Wakafeld *et al.*, 1999; Ohki *et al.*, 1999). La otra variación se produce por el cambio de una lisina o arginina por histidina cerca del extremo N-terminal de la cadena $\beta 3$, sustitución que provoca que la interacción entre proteína y DNA sea más débil. De hecho, sustituciones en la misma posición en MBD1 eliminan la capacidad de unión a DNA (Ohki *et al.*, 1999). A pesar de no tener un dominio de unión a DNA metilado, esta enzima juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, ya que los ratones deficientes en MBD3 son letales antes del estado de blástula (Hendrich *et al.*, 2001).

MBD3 forma parte del complejo remodelador de la cromatina Mi-2/NuRD. Este complejo está formado por histona desacetilasas (HDAC1 y HDAC2), por proteínas que se unen a las histonas (RbAp46 y RbAp48), por la proteína con actividad remodeladora de cromatina Mi-2 y por proteínas asociadas a metástasis (MTA1 y MTA2 y MBD3).

La asociación de MBD2 a Mi-2/NuRD da lugar al complejo MeCP1, inicialmente caracterizado como una única proteína con capacidad de unión a DNA metilado (Meehan *et al.*, 1989) y más tarde como un complejo multiproteico (Ng *et al.*, 1999). El mecanismo de silenciamiento de la transcripción se inicia con la unión de MBD2 a DNA metilado seguido del reclutamiento del complejo Mi-2/NuRD, lo que daría lugar a una hipoacetilación de la cromatina en la zona de metilación del DNA que se asocia a silenciamiento transcripcional y a heterocromatina (Feng y Zhang, 2001).

Sin embargo, también ha sido publicado que MBD2 y MBD3 se asocian de forma mutuamente excluyente al resto de componentes del complejo Mi-2/NuRD dando lugar a dos complejos independientes con propiedades bioquímicas y funcionales diferentes (Le Guezennec *et al.*, 2006). Existen proteínas que forman parte del complejo MBD2/NuRD y no del MBD3/NuRD, como PRMT5, proteína con actividad histona metiltransferasa de residuos arginina (Fabrizio *et al.*, 2002). Según este modelo, el complejo MBD2/NuRD se uniría a DNA metilado dando lugar a metilación de las argininas y a hipoacetilación de las histonas que forman los nucleosomas próximos al sitio de unión del complejo. Este nuevo estado de la cromatina sería la diana del complejo MBD3/NuRD, encargado de propagar la desacetilación de histonas y por lo tanto la represión transcripcional hacia las zonas adyacentes.

Las proteínas MBD2 y MBD3 son las únicas proteínas de la familia MBD con un alto grado de similitud de secuencia fuera del dominio MBD. Utilizando esas regiones como criterio de búsqueda, se caracterizaron dos proteínas similares a MBD2 y MBD3 que carecen del dominio MBD: MBD3L1 y MBD3L2 (Jiang *et al.*, 2002) (figura 8). MBD3L1 se expresa casi exclusivamente en testículo y parece jugar un papel importante en la espermatogénesis (Jiang *et al.*, 2002). *In vivo*, MBD3L1 interacciona y colocaliza con MBD2. En ensayos de inmunoprecipitación también se ha

visto la interacción de MBD3L1 con muchos de los miembros del complejo MeCP1 como HDAC1, HDAC2, MTA2, RbAp46 y RbAp48, pero no con MBD3 (Jiang *et al.*, 2004). Estos datos apoyan la hipótesis de que MBD3L1 se trata de una proteína que reprime la transcripción génica dependiente de metilación al interactuar con MBD2, siendo intercambiable con MBD3 en el complejo Mi-2/NuRD (figura 8A).

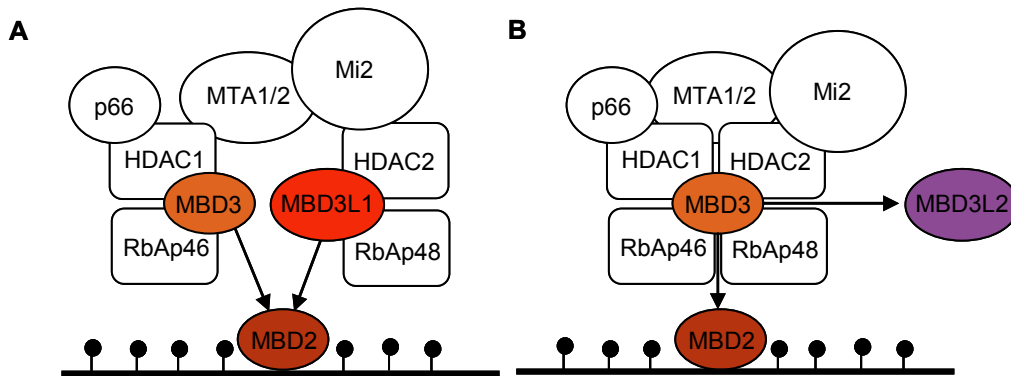


Figura 8. A) Esquema del modelo de funcionamiento de MBD3L1. MBD3L1 interactúa con MBD2 siendo intercambiable por MBD3 en el complejo Mi-2/NuRD (Jiang *et al.*, 2004). B) Esquema del modelo de funcionamiento de MBD3L2. En este caso MBD3L2 interactúa con el complejo Mi-2/NuRD impidiendo la represión transcripcional mediada por MBD2 (Jiang *et al.*, 2005).

MBD3L2, sin embargo, se expresa en todos los tejidos e interactúa y colocaliza con MBD3 pero no con MBD2. En ensayos de inmunoprecipitación se ha visto que interactúa también con miembros del complejo Mi-2/NuRD como HDAC1, HDAC2, MTA1, MBD3, p66, RbAp46, y RbAp48 (Jin *et al.*, 2005). Parece por tanto que en este caso MBD3L2 actúa como un modulador transcripcional que interactúa con MBD3 y el resto de componentes de complejo Mi-2/NuRD impidiendo la unión de MBD2 y por lo tanto permitiendo la transcripción génica de los genes reprimidos por MBD2 (figura 8B).

2.3.2.5 MBD4.

MBD4 forma parte del mecanismo de reparación del DNA. La proteína MBD4 posee, además del dominio MBD en el extremo N-terminal, un dominio catalítico en el extremo C-terminal homólogo al dominio glicosilasa/liasa implicado en la reparación de daños en el DNA en las bacterias. MBD4 actúa como una N-glicosilasa específica de DNA que reconoce timina, uracilo, 5-fluoracilo y, débilmente, 3,N⁴-etenocitosina apareadas con guanina. MBD4 reconoce la secuencia CpG simétricamente metilada, pero tiene mayor afinidad por la secuencia 5mCpG-TpG, producto inmediato de la desaminación del dinucleótido 5mCpG. La desaminación de la 5-mC a timina se produce de forma espontánea, por lo que la actividad glicosilasa de MBD4 hace posible la escisión del error de apareamiento producto de la desaminación, iniciándose así la reparación del DNA (Hendrich *et al.*, 1999) y manteniendo la fidelidad genómica de los sitios CpG a través de la interacción con la proteína MLH1 (*mutL homolog 1*) (Bellacosa *et al.*, 1999). De hecho, los ratones deficientes en MBD4 no sólo muestran una tasa mayor de transiciones de citosinas a timinas en las secuencias CpG (Millar *et al.*, 2002), sino que además, los ratones MBD4^{-/-} con fondo Apc^(Min/+) desarrollan más tumores intestinales con una supervivencia menor que la de los ratones MBD4^{+/+} Apc^(Min/+). La correlación entre la deficiencia en MBD4 y la tumorigénesis intestinal también se ha comprobado en el caso de seres humanos. Así, entre el 26% y el 43% de tumores colorrectales con inestabilidad cromosómica muestran mutaciones en MBD4 (Riccio *et al.*, 1999).

Por lo tanto, MBD4 está relacionada principalmente con el mecanismo de reparación del DNA, aunque también se ha descrito que esta MBD es capaz de reprimir la transcripción génica mediada por metilación de los genes p16/INK4b y MLH1 (Kondo *et al.*, 2005).

2.3.3 Otras proteínas de unión a DNA metilado.

Existen proteínas con capacidad de unión a DNA metilado que carecen del dominio MBD, Kaiso, ZBTB4 y ZBTB38 (figura 9). Kaiso es una proteína de la familia de proteínas con dedos de Zinc BTB/POZ (POZ/ZF) que se une a citosinas metiladas en el contexto de una secuencia consenso compuesta por al menos dos dinucleótidos CpG metilados consecutivos. La actividad represora de Kaiso está mediada por el complejo correpresor N-CoR, con el que interacciona a través del dominio POZ (Yoon *et al.*, 2003), y del que forma parte entre otras proteínas HDAC3 (Guenther *et al.*, 2000).

Kaiso fue identificada como una proteína de unión a p120^{cnt} (proteína que forma parte del complejo de adhesión celular E-cadherina-catenina), por lo que Kaiso podría estar implicada en la regulación de la adhesión y movilidad celulares. Esta observación hace pensar que Kaiso actúa como mediador entre eventos de señalización de la membrana celular y silenciamiento génico dependiente de metilación (Prokhortchouk *et al.*, 2001). Kaiso y p120^{cnt} interaccionan también en el núcleo donde p120^{cnt} regula negativamente la represión génica mediada por Kaiso (Ruzov *et al.*, 2004).

Además de las citosinas metiladas, la proteína Kaiso reconoce la secuencia consenso TCCTGCNA (donde N es cualquier nucleótido) a través de un dominio independiente al de unión a DNA y así reprimir la transcripción génica. La afinidad de Kaiso por esta secuencia consenso es mayor que la afinidad por DNA metilado (Juliet *et al.*, 2002).

Los ratones con fondo Apc^(Min/+) susceptibles a tumores intestinales deficientes en Kaiso muestran resistencia al desarrollo de dichos tumores (Prokhorchout *et al.*, 2006). Este fenotipo es similar al mostrado por los ratones Apc^(Min/+) deficientes en MBD2 por lo que parece que la metilación del DNA y su interpretación juegan un papel importante en el desarrollo de este tipo de tumores.

Además de Kaiso, se han descrito dos proteínas que contienen dedos de zinc similares a los de Kaiso, ZBTB4 y ZBTB38. Ambas proteínas se unen a DNA metilado, pero en este caso una única CpG metilada es suficiente para la unión y represión de la transcripción génica. El patrón de expresión que presentan ZBTB4 y ZBTB38 en diferentes tejidos indica que no tienen papeles redundantes, si bien ambas se encuentran altamente expresadas en cerebro de ratón (Fillion *et al.*, 2006).

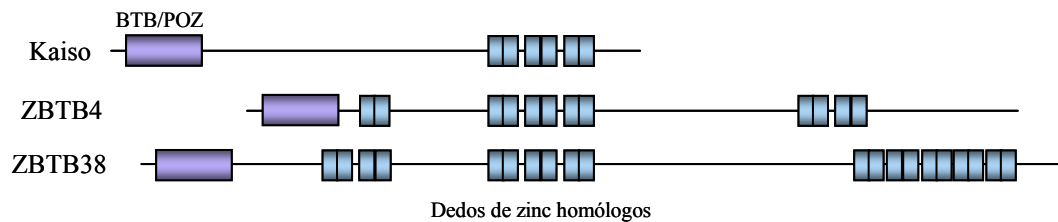


Figura 9. Esquema de la familia de proteínas Kaiso. Estas proteínas se unen al DNA metilado pero carecen del dominio MBD (Fillion *et al.*, 2006).

2.4 Complejo Polycomb.

Otro mecanismo de silenciamiento epigenético lo constituyen los complejos de proteínas del grupo Polycomb (PcG). Las proteínas PcG fueron inicialmente identificadas como reguladoras de los genes *Homeobox* (HOX) durante el desarrollo en *Drosophila melanogaster* (Ringrose y Paro, 2004) y están altamente conservadas en mamíferos. Se cree que están implicadas en el mantenimiento del silenciamiento heredable de los genes HOX (Boyer *et al.*, 2006) y, al igual que la metilación del DNA, también están implicadas en el silenciamiento de los genes imprintados y en la inactivación de uno de los cromosomas X en hembras de mamíferos. El complejo Polycomb y las proteínas MBD cooperan en el mantenimiento del silenciamiento génico prolongado necesario para la inactivación del cromosoma X y el *imprinting*, de hecho, aparecen unidas simultáneamente a estas regiones (Matarazzo *et al.*, 2007).

Las proteínas PcG se agrupan en dos complejos represores llamados PRC1 y PRC2 (PRC, *Polycomb Repressive Complexes*). Estos complejos juegan papeles diferentes en el silenciamiento transcripcional. PRC2 (formado por EED, EZH2, YY1 y SU(Z)12) inicia la represión transcripcional metilando la lisina 27 de H3. A continuación, PRC1 (formado por Ring1b, hPc2 y BMI1) reconoce la trimetil lisina 27 de H3 y establece una represión estable en la zona (Min *et al.*, 20003; Fischle *et al.*, 2003). Además, EZH2, componente del complejo PRC2, interacciona directamente con las proteínas DNMT y parece implicada en el mantenimiento de la metilación del DNA en los promotores a los que se une (Vire *et al.*, 2006). También se ha demostrado la interacción de los componentes de PRC1 Ring1b y hPc2 con MBD1 (Sakamoto *et al.*, 2007). En este caso, parece que la metilación del DNA y la posterior unión de MBD1 junto con las proteínas PcG cooperan en el silenciamiento de los genes HOX y en el mantenimiento de los *foci* de heterocromatina.

2.5 miRNA.

Los miRNA son moléculas pequeñas de RNA no codificante de cadena sencilla que reprimen la expresión génica e intervienen en procesos como la formación de la heterocromatina centromérica. En *Saccharomyces pombe*, la formación de la heterocromatina centromérica, pericentromérica y telomérica está regulada por los complejos modificadores de la cromatina y por complejos relacionados con los miRNA (Verdel *et al.*, 2004). El complejo implicado en el silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS, *RNA-induced Transcriptional Silencing Complex*) contiene dos tipos de actividades: por un lado, una proteína con un chromodominio que se une a la metil-lisina 9 de H3, y por otro proteínas que se unen a Argonauta, proteína que se une a secuencias específicas del DNA gracias a las interacciones con secuencias homólogas a las secuencias de las moléculas de RNA incluídas en el complejo (Moazed *et al.*, 2006).

En mamíferos los miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II como moléculas de RNA de varias kilobases de longitud llamadas pri-miRNA (Lee *et al.*, 2004). Estas moléculas son procesadas en el núcleo por la enzima *Drosha* dando lugar a moléculas de entre 60 y 75 nucleótidos llamada pre-miRNA (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). A continuación tiene lugar un transporte al citoplasma, donde el complejo *Dicer* lleva a cabo un nuevo procesamiento que da lugar a los miRNA de cadena doble. Finalmente, una de las hebras se incorpora al complejo represor llamado RISC (*RNA-induced Silencing Complex*) (Bernstein *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2001), complejo que reprime la transcripción génica dependiente de la homología entre la secuencia del miRNA y del RNA mensajero diana. La otra hebra del miRNA que se genera tras el procesamiento en el citoplasma es degradada (Khvorova *et al.*, 2004) (figura 10).

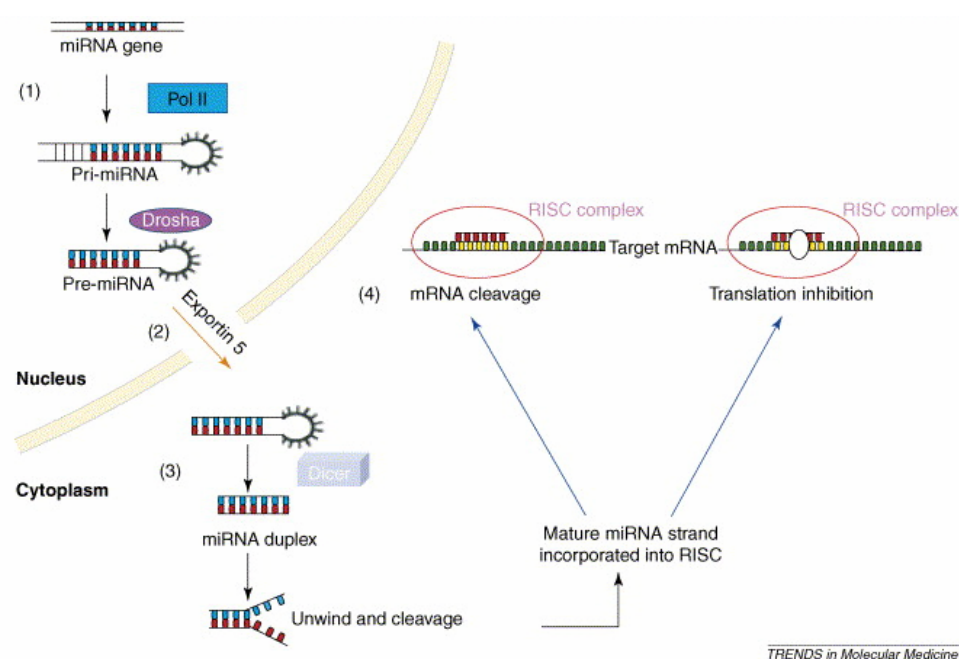


Figura 10. Esquema del mecanismo de procesamiento de los miRNA (Cai y Croce, 2007).

Los miRNA regulan la transcripción génica degradando los RNA mensajeros o inhibiendo la síntesis proteica en función del grado de homología entre el miRNA y la secuencia UTR de los RNA mensajeros. Si la complementaridad de secuencia entre el miRNA y la región 3'UTR del mRNA diana es perfecta o casi perfecta, se induce la degradación del mRNA por el complejo RISC, si la complementaridad es imperfecta se induce silenciamiento traduccional acompañado de cierta degradación del mRNA (He y Hannon, 2004). Se estima que en el hombre alrededor del 30% de los genes son regulados por miRNA (Rajewsky y Socci, 2003).

3. Epigenética y cáncer.

El cáncer es una enfermedad en la que las células pierden los mecanismos de control necesarios para asegurar la homeostasis del individuo. En los tejidos normales, existe un balance entre las tasas de división y muerte celulares. En el caso del cáncer, este balance se altera. Esta alteración puede ocurrir como resultado de un crecimiento celular descontrolado o por la pérdida de los mecanismos de inducción de apoptosis. Las células transformadas forman un tumor en el lugar de origen y pueden, llegado un momento determinado, desplazarse y colonizar nuevos tejidos mediante un proceso denominado metástasis.

El cáncer se genera como producto de una gran variedad de alteraciones genéticas y epigenéticas como amplificaciones génicas, translocaciones, deleciones, mutaciones puntuales, patrones alterados de metilación, etc. El estudio de las causas del cáncer ha hecho posible la detección y tratamiento de muchas neoplasias antes de que se produzca la metástasis.

La aparición de patrones genéticos o epigenéticos que confieren una ventaja adaptativa a una célula permitiendo su proliferación incontrolada. Por lo tanto, la colonización de un tejido o varios, se da como consecuencia de la selección clonal de una célula o grupo de células entre todas las que

forman parte de un tejido. En nuestras células se producen continuamente mutaciones que dan lugar, si los mecanismos de control funcionan correctamente, a un arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis. Cuando una célula adquiere una mutación o patrón epigenético que le permite escapar de estos controles se origina el cáncer.

Los patrones alterados de modificaciones epigenéticas son comunes en muchas enfermedades humanas, entre ellas el cáncer. La metilación del DNA y las modificaciones de las histonas son cruciales en el control de la actividad génica. En cáncer, los patrones normales de metilación del DNA se alteran. Los niveles de metilación global bajan a la vez que se produce una hipermetilación de las islas CpG de genes supresores de tumores. La hipometilación global del genoma tiene como consecuencia un aumento de la inestabilidad cromosómica por activación de secuencias transponibles, así como la activación de secuencias endoparásitas. Por otra parte, la hipermetilación de las islas CpG y consiguiente silenciamiento de genes supresores de tumores, da lugar a la pérdida del control proliferativo de la célula (figura 11).

La metilación de las islas CpG de genes supresores de tumores de diferentes líneas celulares de un determinado tipo de cáncer son similares, existiendo un perfil de metilación específico para cada tipo de tumor (Paz *et al.*, 2003). En tumores primarios los genes que aparecen hipermetilados de forma aberrante también son específicos del tipo de tumor, pudiéndose utilizar el patrón de metilación de determinados genes supresores de tumores para determinar el origen de un tumor (Esteller *et al.*, 2000).

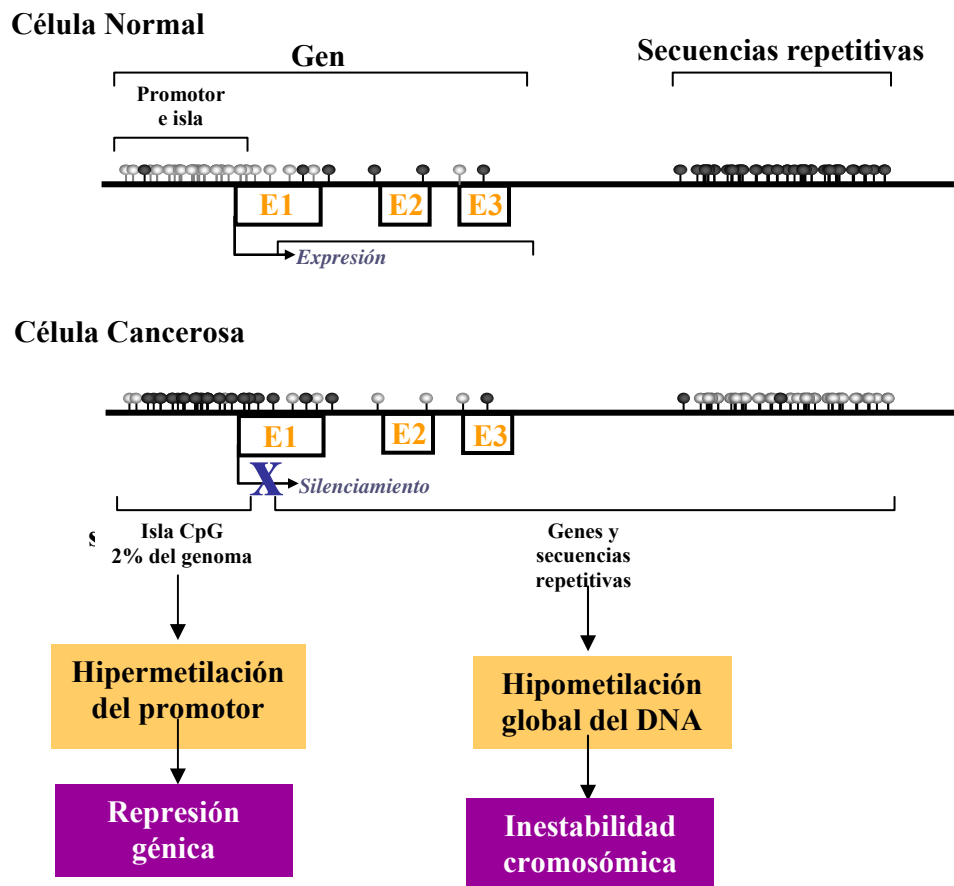


Figura 11. Cambios en la metilación global y sobre las islas CpG que se producen en una célula tumoral. Los círculos blancos representan dinucleótidos CpG no metilados y los negros dinucleótidos CpG metilados.

Los patrones alterados de metilación que aparecen en las células tumorales dan lugar a una redistribución de las proteínas MBD con patrones característicos en algunos tipos de tumores. La hipermetilación de los promotores de los genes supresores de tumores genera nuevas dianas para la unión de los miembros de esta familia de proteínas, dando lugar a la represión transcripcional de dichos genes (Ballestar *et al.*, 2003; López-Serra *et al.*, 2006).

Las modificaciones covalentes de los extremos N-terminales de las histonas también se ven alterados en las células tumorales. Se ha descrito que las células transformadas muestran niveles más bajos de

monoacetilación de la lisina 16 y trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 que las células normales. Estas pérdidas de monoacetilación y trimetilación se asocian con la hipometilación de secuencias repetitivas del DNA característica de las células tumorales (Fraga *et al.*, 2005).

Mutaciones en las proteínas encargadas de regular los patrones epigenéticos de la célula también dan lugar al desarrollo de tumores (Ropero *et al.*, 2006). Una mutación puntual en la secuencia que codifica la proteína HDAC2 da lugar a una forma truncada que carece de actividad desacetilasa, dando lugar a patrones de acetilación alterados. Esta mutación se ha observado en carcinomas esporádicos con inestabilidad cromosómica y en tumores de pacientes con síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

Los miRNA también se han relacionado con el desarrollo de neoplasias. Los patrones de expresión de miRNAs difieren entre tejidos normales y tumorales, estas diferencias son específicas de tumor y en algunos casos están asociados con prognosis (Calin y Croce, 2006). La hipermetilación de las islas CpG de genes que codifican miRNA supresores de tumores (regulan los niveles de expresión de genes implicados en la proliferación celular) y su consiguiente silenciamiento transcripcional, da lugar también al desarrollo de neoplasias (Lujambio *et al.*, 2007).

Objetivos

Se estima que alrededor del 70% de los dinucleótidos CpG del genoma están metilados en mamíferos. La metilación de la citosina tiene lugar mayoritariamente en los dinucleótidos CpG que se encuentran dispersos en el genoma o en los de las secuencias repetitivas de zonas heterocromáticas como las regiones pericentroméricas y teloméricas, mientras que las citosinas de las islas CpG que se encuentran en las zonas promotoras de aproximadamente el 70% de los genes no están metiladas. No obstante, en procesos tumorales los patrones de metilación genómico se invierten y las citosinas que normalmente están metiladas aparecen no metiladas mientras que las citosinas de las islas CpG de muchos genes supresores de tumores y de reparación del DNA se metilan.

La pérdida de metilación en los dinucleótidos CpG de secuencias repetitivas da lugar a una desmetilación global del genoma que se asocia a inestabilidad genómica. Secuencias endoparásitas como transposones pueden cambiar de posición dentro del genoma con graves consecuencias para la célula. Por otro lado, la hipermetilación de las islas CpG de genes supresores de tumores y de genes involucrados en la reparación del DNA da lugar a su silenciamiento transcripcional. Esto provoca en la célula la pérdida de mecanismos de control de varias funciones celulares como la proliferación, la apoptosis, y la reparación del genoma, lo cual puede desembocar en el desarrollo de procesos tumorales y cáncer.

Los mecanismos epigenéticos están interrelacionados y es necesario un control muy preciso de todos los procesos enzimáticos que se producen sobre la cromatina para asegurar el correcto funcionamiento de la célula. La metilación del DNA por un lado y las modificaciones de las histonas por otro están muy relacionadas a través de proteínas reguladoras que establecen un diálogo entre ambos tipos de marcas epigenéticas. En este contexto aparece la familia de proteínas MBD (*Methyl-CpG Binding Domain*) como la encargada de interpretar la información contenida en la metilación del DNA.

Habitualmente las proteínas MBD se asocian a regiones hipermetiladas del genoma como las regiones centroméricas y pericentroméricas, y a regiones de heterocromatina que en general se corresponden con estados de poca actividad de la cromatina. Además, se asocian a promotores de genes regulados por metilación de la isla CpG en tejidos normales como el gen BDNF, al que se une MeCP2. En este contexto, las proteínas de la familia MBD están implicadas en el silenciamiento transcripcional dependiente de metilación al reconocer y unirse a las citosinas metiladas y reclutar complejos modificadores de histonas y remodeladores de la cromatina a los sitios metilados (Bird y Wolffe, 2002). En cáncer, los cambios en el patrón de metilación provocan la aparición de nuevas secuencias metiladas y por tanto da lugar a nuevos sitios de unión para esta familia de proteínas. A pesar de las evidencias de la presencia de proteínas MBD en promotores hipermetilados y de su interacción con complejos correpresores, la implicación directa de estas proteínas en el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores no ha sido estudiada.

En esta tesis se ha investigado el papel de las proteínas MBD en la represión transcripcional de genes implicados en el desarrollo y progresión del cáncer mediante tres aproximaciones experimentales:

1. Caracterización del patrón de unión de las proteínas MBD a genes supresores de tumores hipermetilados en cáncer.
2. Análisis de los efectos de la eliminación de las proteínas MBD sobre la expresión génica y la estructura de la cromatina.
3. Clonación de nuevas isoformas de MBD1 y caracterización de las constantes de afinidad por DNA metilado y no metilado por SPR (*Surface Plasmon Resonante*).

Para el análisis de ocupación de genes se seleccionaron 10 líneas representativas de los tipos de cáncer humano más frecuentes y se analizó el patrón de unión de las MBD en 22 genes supresores de tumores que se

encuentran hipermetilados en algunos tipos de cáncer. Se analizó también el estado de metilación de los promotores y los niveles de expresión de los 22 genes en las 10 líneas celulares de cáncer humano estudiadas.

Las técnicas que se emplearon para determinar el patrón de ocupación de promotores por las MBD fueron:

a) *Western blot* para estudiar los niveles de expresión de las distintas MBD en las líneas celulares de cáncer humano que se incluyeron en este estudio.

b) Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos contra MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 seguida de PCR con oligonucleótidos diseñados para amplificar de forma específica los promotores de los 22 genes supresores de tumores.

c) Secuenciación de bisulfito para determinar el estado de metilación de los promotores de los genes incluidos en el estudio.

d) RT-PCR para analizar la expresión génica de los 22 genes en las 10 líneas celulares de cáncer humano.

Para el estudio de los efectos de la depleción de las proteínas MBD mediante siRNA, células HeLa fueron transfectadas con RNA de interferencia (siRNA) contra MeCP2, MBD1 y MBD2. Se llevaron a cabo interferencias individuales y en distintas combinaciones (MeCP2/MBD1, MeCP2/MBD2, MBD1/MBD2 y MeCP2/MBD1/MBD2) y se analizaron los cambios en el patrón de expresión génica mediante hibridación del cDNA total en un *microarray* de expresión usando como control células HeLa transfectadas con oligonucleótidos aleatorios. MBD3 no fue interferida para los análisis de cambios de expresión por carecer de un dominio MBD funcional en mamíferos.

Los genes sobre-expresados al eliminar las MBD silenciados por hipermetilación aberrante del promotor fueron seleccionados para el análisis de metilación en otras líneas celulares y en tumores primarios. También se reintrodujeron en la célula para analizar su capacidad supresora de tumores

mediante ensayos de formación de colonias, de proliferación celular e implantación subcutánea en ratones atímicos.

Los modificaciones provocadas en la cromatina por la eliminación de las proteínas MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 se analizaron mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE, *High Performance Capillary Electrophoresis*) y *Western blot* de marcas específicas de las histonas relacionadas tanto con activación como con represión transcripcional.

Por último, se clonaron cuatro isoformas de MBD1 que difieren en el número de dominios CxxC y en el extremo C-terminal. Se caracterizaron *in vitro* las constantes de afinidad (KD) por oligonucleótidos sintéticos con diferentes grados de metilación utilizando la tecnología de resonancia plasmática de superficie (SPR, *Surface Plasmon resonante*). Esta técnica permite determinar con exactitud el papel de los dominios CxxC así como el del dominio MBD en la unión de MBD1 al DNA.

Material y métodos

1. Cultivo de líneas celulares.

Las líneas celulares H-1299 (carcinoma de pulmón de célula no pequeña), HCT15 (adenocarcinoma de colon), HL60 (leucemia mielocítica aguda, AML), Raji (linfoma de Burkitt), U937 (linfoma histiocítico), MCF7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), LoVo (adenocarcinoma de colon), SW48 (adenocarcinoma de colon) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix) fueron cultivadas en medio *Dulbecco's modified Eagle's* 4,5 g/l glucosa y L-glutamina suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de Penicilina/estreptomicina en un incubador humidificado a 37° C de temperatura y un 5 % de CO₂.

2. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina.

La línea celular HeLa fue tratada con dosis de 5-aza-2'-deoxicitidina (Aza) 5 µM durante 72 horas con recambio cada 24 horas.

3. Extracción de DNA de células en cultivo.

Para la extracción de DNA se recogieron las células tras levantarlas de la placa incubando 5 minutos con tripsina (Sigma) en el caso de que fueran adherentes, y se centrifugaron durante 5 minutos a 900 g. A continuación de resuspendieron en 2 ml de PBS y se añadieron 2 ml de tampón de lisis de DNA (Sacarosa 0,65 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, Triton x-100 al 2 % (v/v)). Tras mezclar por inversión se incubaron las muestras en hielo durante 5-15 minutos. Tras la incubación en hielo las muestras se centrifugan a 1.800 g durante 5 minutos, el sobrenadante se descarta y el *pellet* (donde se encuentran los núcleos) se pueden congelar en este punto a -80° C.

Los núcleos aislados se resuspendieron en 0,5 ml del tampón de la proteinasa K (Tris-HCl 0,05 M pH 8,5, EDTA pH 8,3 0,1 M, NaCl 0,1 M y SDS 1 % (v/v)), se añadieron 50 µl de proteinasa K (Roche) y 20 µl/ml de RNasa y se incubaron a 37° C durante toda la noche.

A continuación las muestras se transfirieron a tubos *Phase Lock Gel* (PLG) (Eppendorf) y se centrifugaron durante 5 minutos a 15.700 g tras lo que se recuperó la fase acuosa. La fase acuosa se emulsionó con fenol (saturado con tampón TE (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, 1 mM EDTA)) y se incubó durante 15-30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 15.700 g y se recuperó nuevamente la fase acuosa, que se transfirió a un nuevo PLG. Se emulsionó con fenol: cloroformo 1:1 y se incubó durante 15-30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital tras lo que se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 15.700 g y se recuperó la fase acuosa.

La precipitación del DNA se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 3 volúmenes de etanol absoluto e incubando las muestras durante 3 horas a -80° C. Para recuperar el DNA se centrifugó durante 15 minutos a 15.700 g tras lo que se lavaron los *pellets* 2 veces con etanol al 70 % (v/v). Las muestras se resuspendieron en H₂O destilada (MilliQ).

4. Análisis de metilación del DNA.

4.1 Modificación del DNA con bisulfito sódico.

La modificación del DNA con bisulfito sódico provoca de desaminación de las citosinas a uracilo siempre y cuando las citosinas se encuentren no metiladas. Las citosinas metiladas permanecen como citosinas tras el tratamiento. Esta degeneración del DNA provocada por el bisulfito sódico permite estudiar el estado de metilación de una secuencia fácilmente.

La modificación de DNA genómico total con bisulfito sódico se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Herman *et al.*, (1996). 1 µg de DNA genómico se diluye en 50 µl de H₂O destilada. Se añaden 5,7 µl de NaOH 3 M y se incuba a 37° C durante 15 minutos para desnaturalizar el

DNA y hacerlo así sensible al tratamiento con bisulfito sódico. A continuación se añaden 33 µl de hidroquinona 20 mM (SIGMA) y 530 µl de bisulfito sódico 4,3 M pH 5 (SIGMA). Se mezcla bien y se deja incubar durante 16-17 horas a 50° C en oscuridad. La hidroquinona 20 mM y el bisulfito sódico 4,3 M pH 5 (ajustado con NaOH) deben ser preparados en el momento de usarlos ya que se degradan rápidamente en solución acuosa.

A continuación se lleva a cabo la purificación del DNA. Para ello utilizamos *DNA Kit Clean-up®* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al DNA eluido se le añaden 5,7 µl de NaOH (concentración final 0,3 M) para terminar la reacción de desaminación de la citosina a uracilo.

Para precipitar el DNA se añade 1 µl de glucógeno 10 mg/ml (concentración final 200 µg/ml), 17 µl de acetato amónico 10 M (concentración final 2,5 M) y 2 volúmenes de etanol absoluto y se deja a -70° C durante 30 minutos.

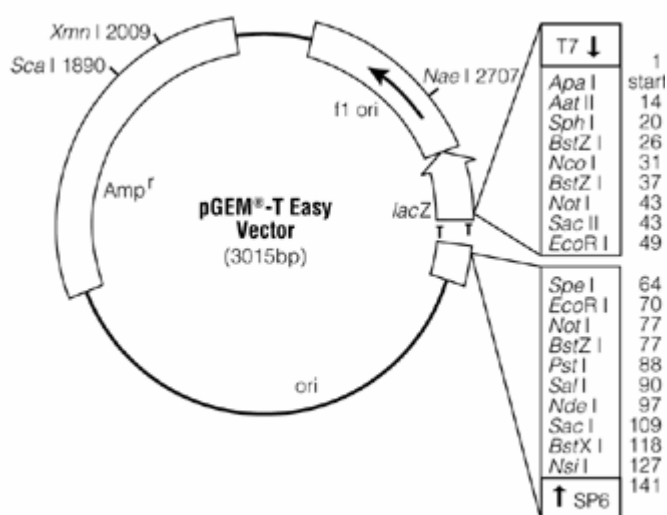
Las muestras se centrifugan durante 20 minutos a 16.000 g en frío y se descarta el sobrenadante. Se lavan con 400 µl de etanol 70 % y tras secar el *pellet* resuspendemos el DNA en 25 µl de H₂O destilada.

4.2 Secuenciación de DNA modificado con bisulfito sódico.

Para el estudio de la metilación por secuenciación, 50 ng de DNA genómico modificado con bisulfito sódico fueron utilizados de molde en las reacciones de PCR para amplificar los promotores de interés. Las PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl con oligonucleótidos específicos para los promotores de los genes estudiados 0,25 µM, tampón 1x de Ecostart, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM y 1,5 U de Taq polimerasa (Ecostart). Las secuencias génicas amplificadas se separan en un gel de agarosa al 2 % y se extraen con el kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). Los oligonucleótidos fueron diseñados alrededor de los inicios de

transcripción de los genes estudiados teniendo en cuenta la secuencia esperada tras la modificación por el tratamiento del DNA con bisulfito sódico.

A continuación clonamos los fragmentos amplificados en el vector pGEMt-easy (Invitrogen) y transformamos bacterias competentes, el sistema X-Gal del vector permite seleccionar los clones positivos para el inserto por el color. Las colonias azules contienen el plásmido religado sin el inserto y las blancas el plásmido con el inserto.



Se seleccionaron 8 clones positivos para cada promotor y se determinaron los estados de metilación de los distintos promotores por secuenciación utilizando como oligonucleótido la secuencia promotora del fago T7 contenida en el vector.

La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems) en la Unidad de Genómica del CNIO.

4.3 PCR específica de metilación (MSP, *Methylation Specific PCR*).

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para cada uno de los genes analizados. Uno amplifica la muestra en el caso de que las citosinas

seguidas de guanina no se encuentren metiladas y por lo tanto la secuencia tras el tratamiento del DNA con bisulfito sódico se transforma apareciendo uracilos (que se convierten en timinas tras el primer ciclo de PCR) en lugar de las citosinas de la secuencia original, y el otro par de oligonucleótidos amplifica la secuencia si la muestra está metilada, en cuyo caso las citosinas seguirían siendo citosinas tras el tratamiento. Por lo tanto, para cada muestra se llevan a cabo dos reacciones de PCR, una que amplifica la secuencia en caso de estar metilada y otra que lo hace en caso de no estarlo, y se analizan en un gel de azarosa al 2 %. En función de que par de oligonucleótidos amplifique se determina el estado de metilación de la muestra. Las PCR se realizaron en un volumen final de 15µl. DNA placentar tratado *in vitro* con la enzima metiltransferasa Sss I fue usado como control positivo de la reacción de metilación para todos los genes.

5. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation assay*).

Los ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron llevados a cabo como se describió previamente por Fournier *et al.* (2002). El entrecruzamiento del DNA y las proteínas que interaccionan con él mediante enlaces covalentes se realizó añadiendo formaldehído (SIGMA) al 1,5 % directamente sobre el medio de cultivo de placas confluentes e incubando durante 15 minutos. La reacción de entrecruzamiento se detiene añadiendo glicina (Fluka) a una concentración final de 0,125 M. El DNA unido a las proteínas se fragmenta mediante sonicación, optimizada para la obtención de fragmentos de cromatina de entre 300 y 1.000 pares de bases. La inmonuprecipitación de la cromatina unida a la proteína de interés se llevó a cabo añadiendo 20 µl de anticuerpo primario específico en 2 ml de muestra. La lista de anticuerpos y las condiciones de uso se pueden consultar en la tabla del apartado 7.3. Una muestra control fue procesada de la misma manera pero no se le añadió ningún anticuerpo (muestra *No*

antibody (Nab)). El DNA unido a cada proteína analizada se recupera mediante un proceso que incluye la captura de los anticuerpos con Proteína A-Agarosa (Upstate) y lavados sucesivos de 5 minutos con tampones de fuerza iónica creciente para finalmente obtener el DNA inmunoprecipitado por el anticuerpo. El primer lavado se realiza con un tampón de baja concentración salina (SDS 0,1 %, Tritón X-100 1 %, EDTA 2mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,1, NaCl 150 mM), el segundo lavado con un tampón de alta concentración salina (SDS 0,1 %, Tritón X-100 1 %, EDTA 2mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,1, NaCl 500 mM), el tercero con un tampón de cloruro de litio (Lic. 0,25 M, NP40 1 %, desoxicolato sódico 1 % pH 8, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,1), los lavados cuarto y quinto se realizan con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,1, EDTA 1 mM). Tras cada lavado las muestras se centrifugan a 2.600 g y se descarta el sobrenadante. El tampón de elución (SDS 1 %, NaHCO₃ 0,1 M) para recuperar el DNA unido a las proteínas de interés se incuban durante 15 minutos tras lo que las muestras se centrifugan recuperando en este caso el material precipitado.

A continuación se añade NaCl a una concentración final de 0,4 M a las muestras y se incuban a 65° C durante 4h para separar el DNA de las proteínas entrecruzadas. Tras esta incubación se añaden 2 µl de proteinasa K 10 mg/ml (Invitrogen) y los tampones proporcionados por la casa comercial y se incuban durante 1h a 55° C. El DNA se purifica emulsionando con fenol: cloroformo 1:1 y lavando con etanol 100 %.

Se realizaron 3 experimentos independientes de ChIP para cada línea celular y anticuerpo. Tras el aislamiento del DNA, las secuencias enriquecidas en cada reacción de inmunoprecipitación fueron analizadas por PCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados en la región promotora de los genes estudiados. Para cada promotor, la sensibilidad de la amplificación de la PCR fue evaluada con diluciones seriadas del DNA total recogido tras la sonicación, la llamada fracción *Input*, que corresponde a la cromatina sin inmunoprecipitar con anticuerpos. Tras la PCR del *Input*, como control

positivo, y de las fracciones unidas a cada anticuerpo, las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 2 %.

6. Análisis de expresión por RT-PCR.

Para la obtención de RNA se utilizó RNeasy kit[®] (Qiagen Inc.) y se digirió con DNasa I libre de RNasas (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el RNA, se retrotranscriben 2 µg de RNA total con *AMV Reverse Transcriptasa* (Promega) usando oligo-dT como cebador. Las PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl. Para la amplificación por PCR se emplearon 0,4 µg de cDNA. Los oligonucleótidos fueron diseñados entre diferentes exones para evitar la amplificación de DNA genómico. Como control de la calidad del cDNA y de carga se amplificó GAPDH.

7. Análisis de expresión proteica.

7.1 Obtención de extractos proteicos totales.

Los extractos proteicos se obtuvieron por lisis celular con el tampón RIPA (1x PBS, 1 % Nonidet P-40 (BDH), 0,5 % deoxicolato sódico, 0,1 % SDS) al que se le añadieron inhibidores de proteasas (Complete[®] Protease Inhibitor Cocktail EDTA Free, Roche) en el momento de la extracción. Tras incubar las muestras 30 minutos en hielo se sonicaron (3 pulsos de 22,5 KHz) manteniendo las muestras en hielo para evitar la degradación de las proteínas. A continuación se añadieron de nuevo inhibidores de proteasas (Complete[®]) y se incubaron durante 30 minutos en hielo tras lo que las muestras fueron centrifugadas a 4° C y 20.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante, que contiene el extracto proteico total, fue alicuotado y guardado a -80° C.

7.2 Medición de la concentración proteica.

La concentración proteica de los extractos se determinó mediante colorimetría utilizando el Bio-Rad Protein Assay Kit, basado en el método de Bradford (Bradford, 1976), que mide la variación de color del reactivo azul brillante de Coomassie G-250, con un máximo de absorbancia de 465 nm a 595 nm una vez unido a la proteína en función de la concentración de esta. Se mezclaron 0,8 µg de proteína con 1ml del reactivo azul brillante de Coomassie y se determinó la concentración midiendo la absorbancia a 595 nm. La curva de calibración se hizo con diluciones seriadas de BSA de 0,2 a 1,4 mg/ml.

7.3 Análisis de expresión por *Western blot*.

100 µg de extracto proteico total fueron fraccionados en un gel de acrilamida-SDS (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Los geles de acrilamida se prepararon a un porcentaje adecuado al tamaño de las proteínas analizadas (7,5-15 % (p/v)) en placas de minigel Xcell SureLock® Mini-Cell (Invitrogen) con un volumen de 10 ml. En primer lugar se preparó un gel separador con acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) (Bio-Rad) 7,5-15 % (p/v), Tris-HCl 0,38M pH 8,8 y SDS 0,1 % (p/v) al que se le añadió persulfato amónico (NH_4SO_2) al 0,1 % (p/v) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida (TEMED) 0,001 %. Se dejó polimerizar el gel durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1ml de isopropanol en la parte superior para evitar la inhibición por oxígeno. El isopropanol fue retirado y sobre el gel separador se cargó un gel concentrador con acrilamida-bisacrilamida (37,5:1), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y SDS 6,5 % al que se le añadió NH_4SO_2 al 0,1 % y TEMED 0,01 %. Se colocaron peines de 1mm de espesor y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Las muestras se dispusieron a la misma concentración y volumen en tampón de carga (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 6,5 % (p/v), glicerol 25 %

(v/v), 2-β-mercaptoetanol 2 M y azul de bromofenol 0,02 % (p/v)) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100° C, tras lo que se pasaron a hielo y se cargaron en el gel. Se cargó también marcador de peso molecular preteñido (Kaleidoscope prestained, Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo a 25 mA en tampón de electroforesis (SDS 0,1 % (p/v), glicina 1,5 % (p/v) y Tris-HCl 0,125 M pH 6,8).

Una vez separadas por tamaño en la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) de 45 μm Immobilon-P (Millipore) previamente activada durante 5 minutos en metanol. La transferencia se realizó en una cubeta Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) durante 3 horas a 60 V en un tampón de SDS 0,1 % (p/v), glicina 1,5% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y metanol al 15 % (v/v) (para la transferencia de proteínas histonas el tampón de electroforesis lleva un 2 % de SDS (p/v)). Después, las membranas fueron bloqueadas en leche (Difko™) al 5 % en PBS con Tween® 20 (Sigma) al 0,1 % (v/v). Tras el bloqueo las membranas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario a una dilución adecuada en PBS-Tween 0,1 % con un 2 % de leche (p/v). A continuación, y tras lavar la membrana con PBS-Tween 0,1 %, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa adecuado diluido en PBS-Tween 0,1 % con 2 % de leche tras lo que se lavaron nuevamente con PBS-Tween 0,1 %. Para la detección de las proteínas marcadas con los anticuerpos se utilizaron los sistemas de quimioluminiscencia ECL® y ECL®Plus *Western Blotting Detection Reagent* (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante y se expusieron a películas fotosensibles de autoradiografía *Ortho CP-G Plus films* (Agfa), utilizando un intensificador de señal (Reflection™ Intensifying Screen, DuPont). El revelado de la autorradiografía expuesta se llevó a cabo con los líquidos habituales de revelado y fijación fotográfica (Agfa).

La relación de anticuerpos primarios y secundarios y las concentraciones utilizados se detallan a continuación:

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución
Rabbit-anti.MeCP2	Abcam	1:1000
Rabbit-anti.MBD1	Abcam	1:1000
Rabbit-anti.MBD2	Abcam	1:1000
Rabbit-anti.MBD3	Abcam	1:1000
Mouse-anti-Nucleolina	Abcam	1:1000
Mouse-anti- β -actina	Sigma	1:10000
Goat-anti-FGF19	Abcam	1:2000
Rabbit-anti-PARVG	Cortesía del Dr. Frässer	1:2500
Rabbit-anti-Histona H3	Upstate	1:1000
Rabbit-anti-AcH4	Upstate	1:2000
Rabbit-anti-AcK16H4	Upstate	1:4000
Rabbit-anti-AcK5H4	Upstate	1:1000
Rabbit-anti-AcK8H4	Upstate	1:1000
Rabbit-anti-AcK12H4	Upstate	1:2000
Rabbit-anti-AcH3	Upstate	1:10000
Rabbit-anti-3mK9H3	Upstate	1:1000
Rabbit-anti-2mK4H3	Upstate	1:1000
Rabbit-anti-3mK4H3	Upstate	1:1000

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución
Donkey-anti-rabbit-IgG	Amersham Bioscience	1:3000
Sheep-anti-mouse-IgG	Amersham Bioscience	1:3000
Rabbit-anti-goat-IgG	Dako	1:3000

Todos los anticuerpos secundarios están conjugados a peroxidasa (HRD, *Horse radish peroxidase*).

8. Transfección de siRNA.

Los siRNA (Qiagen) dirigidos contra cada una de las proteínas MBD que se muestran a continuación fueron transfectados en células Hela a un 70 % de confluencia:

Proteína	Secuencia diana
MeCP2	AAG CAT GAG CCC GTG CAG
	CCC ATT CTG TCC TAC CTT TAA
	Validado
MBD1	CCT GAG GAT AAC TCA ATA TAA
	AAC GAG GTG ATC TAG CAG ATA
	AAG GAT GAT TCT GCC TCC AAA
MBD2	AAG AGG ATG GAT TGC CCG GCC
	TCG CGA GCT GCT GAT ACA GAA
	ACC CTT CAG GTG TTA CTA GAA
MBD3	CCA GAC GGC GTC CAT CTT CAA
	CGG GAA GAA GTT CCG CAG CAA
	Validado

Inmediatamente antes de la transfección se eliminó el medio de cultivo de las placas de 60 mm (Nunc) con las células y se añadió Optimem (Gibco) sin antibióticos ni suero bovino fetal (SBF). A 500 µl de Optimem (Gibco) se añadieron 5 µl de Oligofectamina (Invitrogen) y los siRNA a una concentración final de 0,2 µM, y tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente se añadió a las células, que se incubaron 24 horas a 37° C en un incubador con atmósfera húmeda al 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se retiró el Optimem y se añadió D-MEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Tras 48 horas las células fueron recogidas.

9. Análisis de expresión global por *microarray*.

Para los análisis de expresión por *microarray* utilizamos el *CNIO OncoChip*, el cual es un *microarray* de cDNA que ha sido específicamente diseñado para buscar genes implicados en cáncer e incluye tanto genes revelantes en cáncer como genes implicados en la respuesta a drogas, genes específicos de tejido y genes control. Hay un total de 6.386 genes representados por 7.237 clones. Los clones de cDNA humanos son clones de secuencias confirmadas por I.M.A.G.E., incluyendo 5.253 clones de genes conocidos, y los 1.984 restantes representan etiquetas de secuencias expresadas (EST). La lista completa de genes del *microarray* se puede encontrar en la dirección de internet: <http://bioinfo.cnio.es/data/oncochip>.

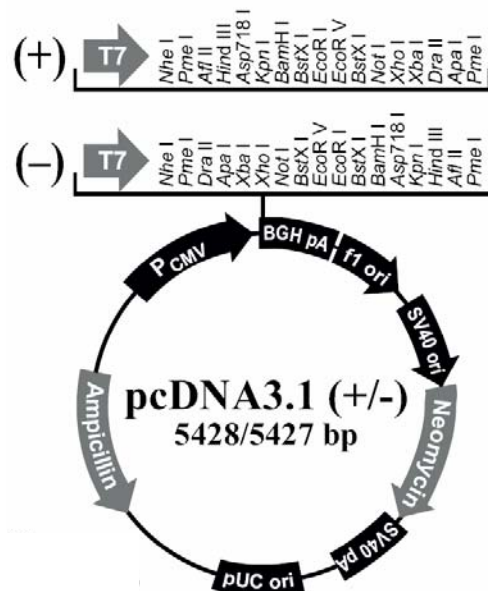
El RNA total aislado de las células se retrotranscribe a cDNA de doble cadena con *Superscript Choice System* (Life Technologies) usando oligo-dT con un promotor para la RNA polimerasa de T7 como oligo. La primera cadena fluorescente del cDNA de la muestra se marca con Cy5-dCTP (rojo) y el cDNA control se marca con Cy3-dCTP (verde). Las placas se hibridan simultáneamente con muestra y estándar marcados y después se escanean para la fluorescencia de Cy3 y de Cy5 empleando Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics Kanata, Ontario, Canada) y se cuantifica con *Quantarray software* (GSI Lumonics) y/o *GenePix Pro 4.0 software* (Axon Instruments Inc., Union City, CA).

Los datos escaneados se ajustan a una plantilla con la identidad de cada clon y a continuación se filtran. Un primer filtrado depende de la calidad de cada lote de placas de *microarray* y un segundo filtrado elimina los clones para los que la relación señal respecto a ruido es demasiado baja y los clones con señal saturada.

10. Clonación en el vector de expresión pCDNA3.1(+).

Utilizamos cDNA de linfocitos normales para amplificar los genes FGF19 y PARVG. Los oligonucleótidos fueron diseñados con las dianas de restricción Hind III y Not I (Takara).

Las PCR se realizaron en 50 µl utilizando la polimerasa Pfx50 (Invitrogen). Las PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1 % y los fragmentos se extrajeron con QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). A continuación clonamos los fragmentos en el vector pCDNA3.1(+), que contiene el gen de resistencia a G-418 (Invitrogen). Para ello, el vector y el fragmento fueron ligados con la ligasa T4 (Promega) incubando los DNA 3h a 15° C en una proporción 1:3 respectivamente.



11. Transfección y selección de clones.

Las células fueron electroporadas siguiendo el protocolo normal de electroporación. 5×10^6 células fueron lavadas 3 veces en PBS tras tripsinizar, se resuspendieron en 750 µl de PBS y se les añadieron 30 mg de vector. Las células fueron electroporadas a 250 mV, 950 µF y máxima capacitancia con un electroporador Gene pulse® II (Bio-Rad). A

continuación se sembraron en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal al 10 %. 24h después se añadió G-418 (Invitrogen) a una concentración final de 1mg/ml para seleccionar las células transfectadas.

Tras 7 días de crecimiento con G-418 se llevó a cabo una dilución límite de las células. Para cada vector electroporado se aislaron 120 clones y se comprobó la expresión de las proteínas por *Western blot*. Como control negativo se utilizaron células transfectadas con el plásmido vacío (*mock*). Como control de carga se analizaron los niveles de β -actina.

12. Ensayo de crecimiento.

Para analizar el crecimiento de las células transfectadas se sembraron células con el plásmido vacío, células transfectadas y positivas para FGF19 y células transfectadas y positivas para PARVG a diferentes concentraciones (500, 1.000, 2.000 y 2.500 células/100 μ l) en placas de 96 pocillos (Nunc). Se sembraron 5 placas para cada vector y se analizó el número de células vivas cada 24h mediante tinción con 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difeniltetrazolium (MTT) (Sigma). El MTT se une a un complejo mitocondrial sólo si la célula está respirando y esto conlleva un cambio en su espectro de absorción con un máximo a 595nm. El cálculo indirecto del grado de unión de este compuesto mediante la medida de la absorbancia permite calcular la cantidad de células vivas en cada muestra. La absorbancia del MTT fue medida con un espectrofotómetro (Bio-tek).

13. Ensayo de formación de colonias.

Un clon positivo para FGF19, uno positivo para PARVG y células mock (transfectadas con el plásmido vacío) fueron sembradas a diferentes concentraciones (500, 1.000, 2.000 y 4.000 células/100 μ l) y se dejaron crecer en medio con 1mg/ml de G-418 (Invitrogen) en placas de 12 pocillos

(Nuncclon) hasta la formación de colonias visibles. Una vez formadas las colonias se tiñeron con MTT y se contaron.

14. Implante subcutáneo de células en ratones atímicos.

Se inyectaron subcutáneamente 2×10^6 células HeLa transfectadas con el vector pCDNA 3.1(+) en el flanco izquierdo de 10 ratones atímicos, 2×10^6 células HeLa transfectadas con el cDNA de FGF19 insertado en pCDNA 3.1(+) en el flanco derecho y 1×10^6 células HeLa transfectadas con el cDNA de PARVG insertado en pCDNA 3.1(+) en el hombro izquierdo. Para llevar a cabo el implante subcutáneo, células en fase exponencial de crecimiento se levantan con Tripsina (Sigma), se lavan dos veces con PBS y se resuspenden en 100 μ l de PBS.

Los animales fueron observados diariamente hasta el fin del estudio que se produjo cuando el volumen del tumor excedió 1.000 mm³ o se produjo ulcerización del tumor (21 días). El tamaño de los tumores y el peso corporal fueron medidos dos veces por semana.

15. Análisis de modificaciones de histonas.

15.1 Extracción ácida de histonas.

20×10^6 células tripsinizadas y lavadas con PBS se resuspendieron en 200 μ l de HCl 0,25 M y se incubaron durante toda la noche a 10° C en agitación. A continuación se centrifugaron a 9.600 g durante 10 minutos a 4° C y se recogió el sobrenadante. Se añadieron 8 volúmenes de acetona (Merk) a cada muestra para precipitar las histonas y se incubaron a 4° C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 8 minutos, el *pellet* se lava con 1 ml de acetona y tras centrifugar nuevamente se deja secar. Las histonas ya extraídas se resuspenden en 300 ml de HCl 0,25 mM.

La pureza de las histonas se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul brillante de *Coomassie*.

15.2 Purificación de las fracciones de histonas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa.

Una vez hecha la extracción ácida de histonas se fraccionaron y purificaron mediante HPLC de fase reversa con una columna *Delta-Pak® C18 Waters* en un *Beckman HPLC Gradient System®* (Beckman-Coulter). Las diferentes fracciones de histonas fueron eluidas mediante un gradiente de acetonitrilo (20-60 %) en ácido trifluoroacético 0,3 % (v/v). El flujo de la fase móvil se mantuvo constante a 1ml/min y la detección de las histonas se realizó midiendo la absorbancia a 220 nm.

Las fracciones de las histonas eluidas se recogieron con un colector FC 203B (Gilson) y se congelaron en hielo seco antes de ser liofilizadas.

15.3 Análisis de las fracciones de histonas purificadas mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE).

Las formas no acetiladas, mono-, di-, tri- y tetra-acetiladas de las fracciones de las histonas H3 y H4 se resolvieron mediante HPCE utilizando un capilar no recubierto de sílica (Beckman-Coulter) (60.2 cm x 75 µm, longitud efectiva 50 cm) en un sistema de electroforesis capilar *P/ACE® MDQ* (Beckman-Coulter) conectado a una estación de procesamiento de datos (32 KaratTM Software).

16. Expresión de proteínas.

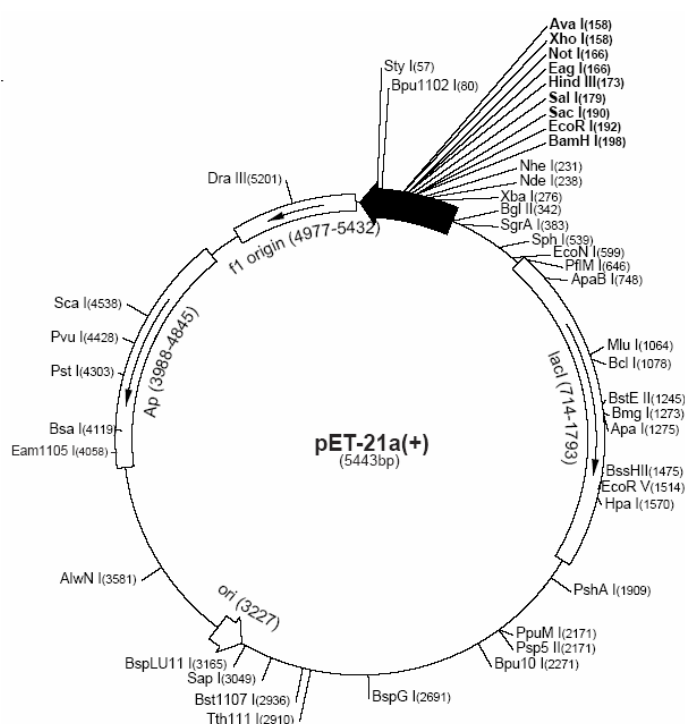
16.1 Clonación de las isoformas de MBD1.

cDNA total de la línea celular SW48 fue utilizado como molde de la reacción de PCR con oligonucleótidos diseñados para amplificar las

distintas isoformas de MBD1. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

MBD1-F	GGGAACTCCATATGGCTGAGGACTGGCTGGAC
MBD1v1,v3,v4-R	CCGGAATTCGGCTGCTTTCTAGCTCCAGGTTT
MBD1v2-R	CCGGAATTCGGACTCTGTGAGGAAGGGCACCA
MBD1v6-R	CCGGAATTCGGAATGTCAATCAAATAAATTTC

Las isoformas amplificadas se clonaron en el vector de expresión en bacteria pET21b (Novagen), los clones positivos se seleccionaron suplementando el medio con 50 µg/ml de ampicilina.



El plásmido pET21b(+) es igual que el pE21a(+) salvo en que tiene 1pb menos a cada lado del sitio de restricción *Bam*HI en la posición 198.

16.2 Expresión de proteínas en *Escherichia coli*.

Se crecieron colonias individuales de células BL21 (DE3) transformadas con el vector de expresión pET21b (Novagen) con el inserto

en medio LB suplementado con 50 µg/ml de Ampicilina durante toda la noche a 37 °C en agitación. A continuación, se relanzaron los cultivos diluyendo el cultivo original 100 veces en medio LB al que se le añadieron 50 µg/ml ampicilina y se crecieron a 37°C en agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (Densidad Óptica medida a 600nm= 0,6). En este momento se le añadió Isopropil 1-thio-β-D-galactopiranosido (IPTG) 0,4 mM para inducir la expresión proteica. Tras 3 horas de inducción se centrifugaron las células y se resuspendió el pellet en 0,005 volúmenes de Bugbuster (Novagen) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete® Protease Inhibitor Cocktail EDTA Free, Roche), lisozima (rLysozyme®, Novagen) y benzonasa (Benzonase® Nuclease, Novagen) para lisar las células. Los extractos proteicos se incubaron durante 20 minutos en rotación a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 minutos a 15.700 g, separando así las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (*pellet*). Se analizaron los niveles de expresión y solubilidad de las proteínas mediante tinción con azul brillante de *Coomassie* tras electroforesis SDS-PAGE al 10 % y por *Western blot* utilizando como anticuerpo primario anti-MBD1.

16.3 Purificación de proteínas fusionadas a 6xHistidina.

La clonación en el vector pET21b produce proteínas con una cola de 6 histidinas en su extremo C-terminal. Esta cola de histidinas permite la purificación mediante una cromatografía de afinidad en columnas Hi-Trap™ HP (Amersham Biosciences) con un equipo ÄKTA Prime (Amersham Biosciences). Como tampón de equilibrado de la columna se utilizó fosfato sódico 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, 20 mM imidazol (Merk) y como tampón de elución el mismo que el de equilibrado con una concentración de imidazol de 0,5 M. Todos los tampones fueron filtrados (Sartorius, 0,45 µm) y desgasificados.

Para una columna de 1ml se inyectaron 20 ml de fracción soluble diluida a la mitad en tampón de equilibrado y filtradas (Sartorius, 45 µm).

Una vez recogidas las fracciones eluidas, se comprobó la pureza de las proteínas mediante tinción con azul brillante de *Coomassie* tras electroforesis SDS-PAGE al 10 %. Una vez purificadas, las proteínas se dializaron durante toda la noche en membranas de diálisis (Medicell International Ltd) a 4° C y agitación frente a PBS para eliminar el imidazol y se congelaron a -20° C para su conservación.

17. Bicatenización de oligonucleótidos complementarios y biotinilación de extremos.

Se diseñaron oligonucleótidos con la misma secuencia pero distinto grado de metilación (sin citosinas metiladas: GAM; con una citosina metilada: GAC1, con 12 citosinas metiladas: GAM12) (Operon):

GAM1-F	GATCCGACGACGACGACGA ^m CACGACGACGACGACGACGATC
GAM1-R	GATCGTCGTCGTCGTCGTCGT ^m CGTCGTCGTCGTCGTCGGATC
GAC-F	GATCCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATC
GAC-R	GATCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGGATC
GAM12-F	GATC ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGA ^m CGATC
GAM12-R	GAT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGT ^m CGGATC

50 µl de cada hebra de cada pareja de oligonucleótidos a una concentración 100 µM fueron mezclados equimolarmente para su bicatenización. A continuación se incubaron en un baño a 95°C y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

0,05 µmoles de cada pareja de oligonucleótidos se biotinilaron utilizando dUTP biotinilado (Roche) como sustrato de la reacción de la transferasa terminal TdT (*Terminal Transferase*, Roche). La mezcla formada por el dUTP-biotinilado, los oligonucleótidos y la enzima junto con los tampones suministrados por el fabricante y CoCl₂ como cofactor de la reacción se incubó durante 1 hora a 37°C siguiendo las instrucciones del

fabricante.

18. Análisis de afinidad por SPR (*Surface Plasmon Resonance*).

Para el estudio de las constantes de afinidad de las isoformas de MBD1 se utilizó el equipo BIAcore X (BIAcore).

Placas CM5 (BIAcore) fueron fijadas con estreptavidina (Vector laboratories), la superficie libre no unida a estreptavidina se bloqueó con etanolamina 1 M (BIAcore). Se fijaron los oligonucleótidos biotinilados GAC, GAM y GAM12 aprovechando la afinidad de la biotina por la estreptavidina. Para ello se prepararon a una concentración final de 50 µg/ml en tampón acetato de sodio 10 mM pH 4,0 y se inyectaron durante el tiempo necesario hasta alcanzar las RU (*Resonance Units*, unidades arbitrarias de resonancia) deseadas en cada caso. El flujo utilizado en la fijación fue de 10 µl/minuto y el tampón PBS Surfactante p20 0,005 % (BIAcore).

Para el análisis de las constantes de afinidad de las isoformas se utilizó un flujo de 20 µl/minuto y diferentes diluciones de las proteínas se inyectaron durante 2 minutos. Las concentraciones de las diluciones utilizadas fueron de 1, 0,5, 0,75 y 0,25 µM. Tras cada medida se regeneró la placa CM5 (BIAcore) fijadas con estreptavidina y los oligonucleótidos inyectando 10 µl de glicina-HCl 10 mM pH 2.

Una vez obtenidos los sensorgramas, las constantes de afinidad se calcularon utilizando el programa *BIAsoftware* (BIAcore) siguiendo el modelo de Langmuir 1:1. Este programa calcula la constante de afinidad (KD) dividiendo la pendiente de la curva de disociación (Kd) entre la pendiente de la curva de asociación (Ka) (figura 12).

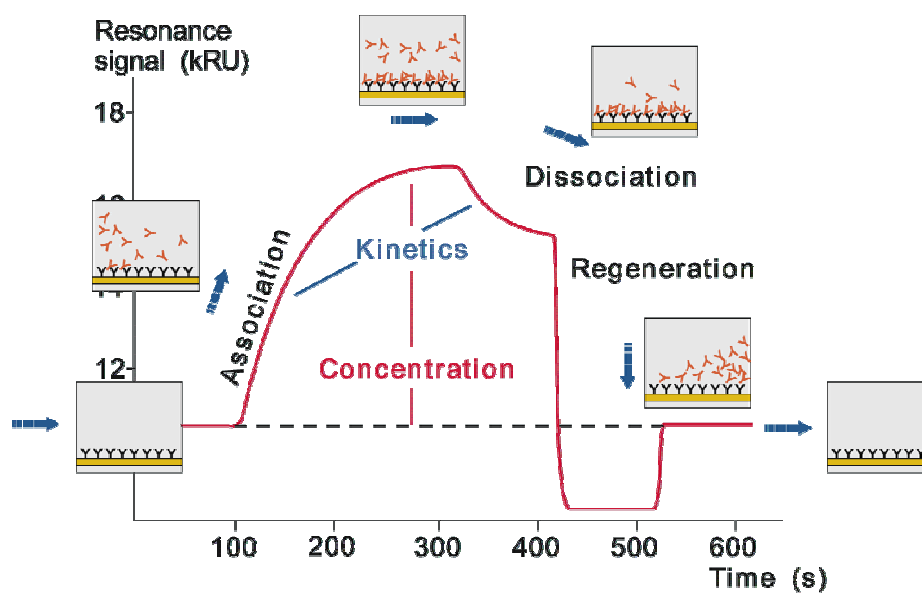


Figura 12. Esquema de un sensorgrama típico obtenido por BiaCore. El cociente entre las pendientes de las curvas de disociación y asociación es la constante de afinidad.

Resultados

Caracterización del patrón de unión de proteínas MBD (*Methyl-CpG Binding Domain*) a genes supresores de tumores hipermetilados en cáncer

En cáncer, un gran número de genes supresores de tumores aparecen silenciados debido a la hipermetilación de las islas CpG de sus regiones promotoras. Las proteínas MBD están implicadas en este silenciamiento al reclutar a secuencias metiladas la maquinaria modificadora y remodeladora de la cromatina que da lugar a la inactivación transcripcional. En esta tesis doctoral se determinó el patrón de unión de proteínas MBD a las islas CpG de 22 genes implicados en la aparición y desarrollo del cáncer en 10 líneas celulares de origen tumoral y se correlacionó con los patrones de expresión de las proteínas MBD en las 10 líneas celulares así como con los niveles de expresión de los 22 genes incluidos en el estudio.

1.1 Análisis de la expresión de proteínas MBD en líneas celulares de origen tumoral.

Se analizó por *Western blot* la expresión de las proteínas MBD en las líneas celulares de cáncer humano H1299 (carcinoma de pulmón de célula no pequeña), HCT15, LoVo y SW48 (adenocarcinomas de cérvix), HeLa (carcinoma de cérvix), HL60 (leucemia mielocítica aguda, AML), Raji (linfoma de Burkitt) y U937 (linfoma histiocítico), MCF7 y MDA-MB-231 (adenocarcinomas de mama) con anticuerpos policlonales contra MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 (Abcam). El anticuerpo utilizado contra MBD3 reconoce las dos isoformas descritas de esta proteína, mientras que el anticuerpo contra MBD1 reconoce sólo tres de las seis isoformas descritas previamente (Fujita *et al.*, 2000). El anticuerpo empleado para detectar MBD2 reconoce sólo una de las dos isoformas descritas, la isoforma MBD2a, ya que este anticuerpo está diseñado contra la región del extremo

N-terminal de la que carece la isoforma MBD2b. Todas las líneas celulares estudiadas expresan las cuatro MBD (figura 12).

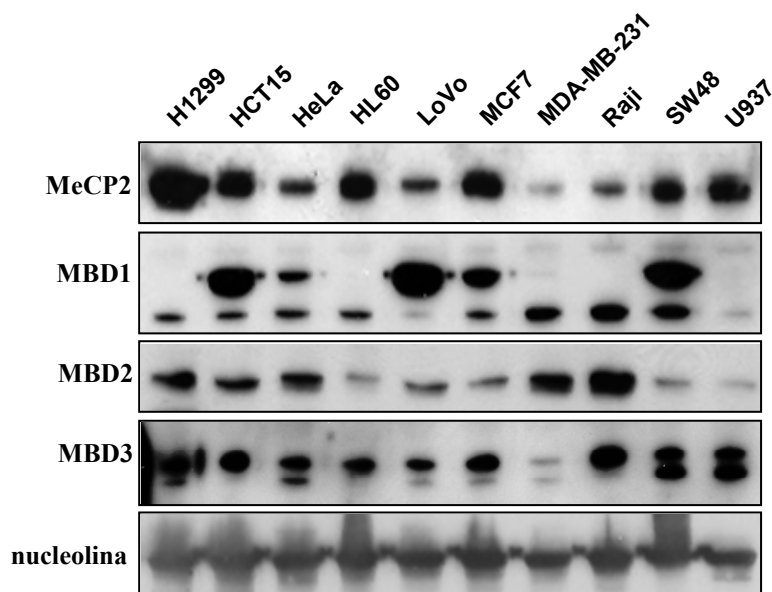


Figura 12. Análisis de expresión de proteínas MBD por *Western blot*. Las 10 líneas celulares fueron analizadas con anticuerpos contra MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3. Como control de carga se analizaron los niveles de nucleolina.

MeCP2 se detecta en todas las líneas celulares estudiadas, sin embargo los niveles de expresión difieren de unas a otras. H1299 es la que más expresa esta MBD, mientras que MDA-MB-231 y Raji son las líneas que muestran niveles de MeCP2 más bajos.

Como ya hemos dicho, el anticuerpo utilizado contra MBD1 reconoce tres de las seis isoformas descritas previamente. La de mayor peso molecular presenta niveles similares y muy bajos en relación al resto de isoformas de MBD1 en todas las líneas celulares. Por contra, las otras dos isoformas reconocidas por el anticuerpo muestran gran variabilidad de expresión de una línea celular a otra. Las líneas H1299, HL60, MDA-MB-231, Raji y U937 no presentan niveles detectables de la isoforma de peso molecular intermedio, mientras que entre las que la expresan, SW48, LoVo

y HCT15 (las tres líneas de cáncer de colon) presentan niveles muy altos de esta isoforma. La isoforma de menor peso molecular presenta niveles similares en todas las líneas celulares excepto en LoVo y U937, que tienen niveles de expresión muy bajos de esta isoforma. 5 de las 10 líneas celulares tienen niveles altos de una única isoforma: H-1299, HL60, MDA-MB-231 y Raji de la isoforma de MBD1 de menor peso molecular, y LoVo de la isoforma de peso molecular intermedio. Además, U937 presenta niveles bajos de todas las isoformas detectables de MBD1, lo que no quiere decir que no requiera de alguna de las isoformas expresada de forma mayoritaria para su viabilidad ya que la isoforma mayoritaria podría ser alguna de las que no detecta el anticuerpo contra MBD1.

El estudio de la isoforma MBD2a de MBD2 presenta un patrón de expresión bastante similar en las distintas líneas celulares, sobre todo si lo comparamos con la variabilidad observada para las distintas isoformas de MBD1. Raji es la que presenta un nivel de expresión de MBD2a mayor, mientras que HL60, LoVo, MCF7, SW48 y U937 presentan niveles bajos de MBD2a.

Para la isoforma de mayor peso molecular de MBD3 se observa un patrón de expresión muy similar en todas las líneas celulares estudiadas. Sólo MDA-MB-231 presenta un nivel de expresión relativamente bajo. Sin embargo, la isoforma de menor tamaño presenta gran variabilidad de expresión entre las líneas. Así, mientras SW48 y U937 presentan niveles similares de ambas isoformas, H-1299, HeLa, MDA-MB-231, LoVo y MCF7 muestran un patrón de expresión en el que la isoforma de mayor peso molecular es más abundante que la isoforma más pequeña. HCT15, HL60 y Raji no muestran niveles detectables de la isoforma menor y expresan sólo la isoforma de mayor peso molecular.

Comparando la expresión de las distintas MBD para cada línea celular, el patrón de expresión de las diferentes MBD que se observa es muy variable. Las líneas celulares HeLa, HCT 15, HL60, MCF7 y Raji muestran

niveles de expresión similares para todas las proteínas MBD, sin embargo, otras como H1299, LoVo y SW48 presentan alguna de las MBD en mucha mayor proporción que el resto. H1299 presenta niveles muy elevados de MeCP2 en relación a las otras MBD, y LoVo y SW48 muestran mayor proporción de la isoforma de MBD1 de tamaño intermedio. MDA-MB-231 expresa niveles elevados de dos de las cuatro MBD (la isoforma de menor peso molecular de MBD1 y MBD2), y U937 expresa también sólo dos MBD en cantidades detectables, en este caso MeCP2 y MBD3.

La importancia de las diferentes MBD en la transformación tumoral puede verse reflejada en los patrones específicos de expresión observados mediante *Western blot* en las diferentes líneas celulares que acabamos de mostrar, como por ejemplo el patrón observado en las tres líneas de cáncer de colon LoVo, SW48 y HCT15. En estas líneas la isoforma de tamaño intermedio de MBD1 es la proteína MBD más abundante y sólo en estas tres líneas de cáncer de colon es esta isoforma la MBD mayoritaria. Esto podría indicar que la expresión de dicha isoforma de MBD1 es una característica de la transformación tumoral en cáncer de colon, aunque su papel e importancia es desconocido.

1.2 Perfil de unión de proteínas MBD a islas CpG de genes implicados en desarrollo y progresión tumorales en líneas celulares de cáncer humano.

Se analizó el perfil de metilación de un panel de 22 islas CpG en las 10 líneas celulares mencionadas. Se seleccionaron promotores de genes implicados en desarrollo y progresión tumorales para los que había sido descrita previamente la hipermetilación de la isla CpG en algún tipo de cáncer (Jones *et al.*, 1999; Costello y Plass, 2001; Esteller, 2002; Herman y Baylin, 2003; Costello *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2001; Smiraglia *et al.*, 2001; Paz *et al.*, 2003). En el total de 22 genes estudiados, se incluyen genes supresores de tumores (p16INK4a, p15INK4b, p14ARF, p73), genes de

reparación del DNA (hMLH1, *human MutL homolog 1*; GSTP1, *Glutathione S-transferase pi*; MGMT, *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*), genes implicados en metástasis e invasión (CDH1, *Cadherin 1*; CDH13, *Cadherin 13*; TIMP2, *Tissue inhibitor of metalloproteinases 2*; TIMP3, *Tissue inhibitor of metalloproteinases 3*), apoptosis (DAPK1, *Death-associated protein kinase 1*; TMS1, *Target of methylation-induced silencing-1*), señalización celular y mitosis (SYK, *Spleen tyrosine kinase*; SOCS1, *Suppressor of cytokine signaling 1*; CHFR, *Checkpoint with forkhead and ring finger domains*; RASSF1A, *Tumor suppressor protein RDA32*) y receptores hormonales (PR, *Progesterone receptor*; ER1, *Estrogen receptor 1*; RARB2, *Retinoic acid receptor beta 2*; CRBP1, *Retinol-binding Protein 1*). Todos estos genes se caracterizan por poseer una isla CpG en la región 5' que no está metilada en tejidos normales, por lo que son candidatos a jugar un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer. Se diseñaron un par de oligonucleótidos para la clonación y posterior secuenciación del promotor tras el tratamiento con bisulfito sódico, dos pares para PCR específica de metilación (MSP, *methylation specific PCR*), uno para la reacción de no metilación y otro para la de metilación, y un cuarto par de oligonucleótidos contra la secuencia de DNA genómico para analizar la presencia de proteínas MBD en secuencias de DNA aisladas por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation*) utilizando los anticuerpos anti-MeCP2, anti-MBD1, anti-MBD2 y anti-MBD3 descritos previamente. Las cuatro parejas de oligonucleótidos amplifican en la misma región del promotor. Se analizaron también los niveles de expresión de estos genes por RT-PCR (*Retrotranscription-PCR*). Para cada muestra se extrajo en paralelo DNA, RNA y se entrecruzaron células con formaldehído para ChIP.

Combinando los datos de metilación de las islas CpG estudiadas con los de ocupación de proteínas MBD para los diferentes promotores y las diferentes líneas celulares (ejemplos en la figura 13) obtenemos el patrón de

distribución de proteínas MBD en función de la metilación para cada línea estudiada que se observa en la figura 14. Los datos muestran que las proteínas MBD se asocian a islas CpG hipermetiladas *in vivo*, lo cual concuerda con los datos de afinidad por DNA metilado y no metilado obtenidos *in vitro* que muestran que las MBD tienen más afinidad por DNA metilado que por DNA no metilado (Fraga *et al.*, 2003).

Analizando los datos de metilación obtenidos observamos que de los 22 promotores en las 10 líneas celulares estudiados, existen 136 loci metilados y 84 no metilados. Encontramos unión de alguna de las MBD en el 89% (121 de 136) de los promotores metilados mientras que sólo el 28% (26 de 84) de los promotores no metilados mostraron asociada alguna MBD, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (test exacto de Fisher $p < 0.001$). Estos resultados reflejan la preferencia de las proteínas MBD por secuencias metiladas (test Chi-cuadrado, $p < 0.001$) y una clara correlación entre hipermetilación de promotores y reclutamiento de proteínas MBD (coeficiente de correlación tau de Kendall $r = 0.549$, $p < 0.001$) (figura 15A).

La importancia y significación de la correlación entre presencia de proteínas MBD y metilación de islas CpG aumenta si tenemos en cuenta el hecho de que MBD1 posee dominios de unión a DNA no metilado además del dominio de unión a DNA metilado. Así, la mayoría de los promotores no metilados ocupados por alguna MBD lo están por MBD1 (88%, 23 de 26). Si excluimos MBD1 del análisis de los datos obtenidos, ya que esta MBD puede unirse a DNA no metilado, sólo el 5% de los sitios no metilados (3 de 84) contiene alguna MBD que no sea MBD1, comparado con el 89% de los metilados que contiene alguna de las cuatro MBD incluídas en el estudio. Esta diferencia es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher, $p < 0.001$).

En los casos en los que observamos más de una MBD unida a una isla CpG hipermetilada en una línea celular determinada se plantea la duda de si se trata de una ocupación múltiple, es decir, hay distintas MBD en el

mismo promotor, o si este evento se da en promotores diferentes y las distintas células del cultivo de la línea celular presentan distintas MBD unidas a los genes hipermetilados. La técnica empleada, inmunoprecipitación de cromatina, impide resolver este dilema. Aún así, los datos obtenidos muestran que más del 50% de las islas CpG hipermetiladas presentan sólo una de las proteínas MBD unida (figura 15C).

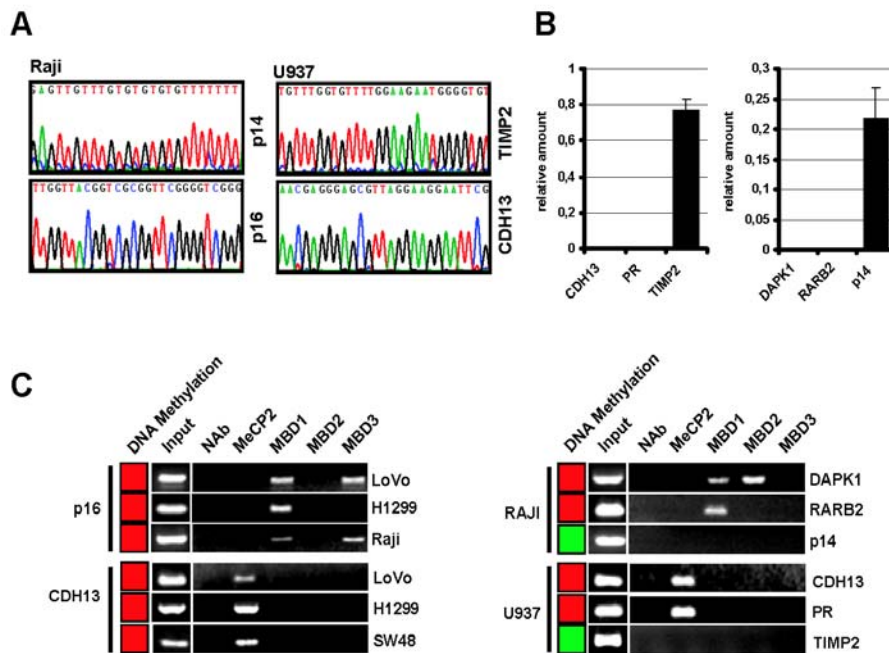


Figura 13. Análisis de metilación de las islas CpG, de expresión y de ocupación de proteínas MBD. A) Ejemplo de la secuenciación de DNA genómico tras el tratamiento con bisulfito sódico. B) Ejemplos del análisis de expresión génica por RT-PCR semicuantitativa. C) Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos contra MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3. Se muestran ejemplos de los promotores de dos genes (p16^{INK4a} y CDH13) en diferentes líneas celulares (izquierda) y varios promotores para dos líneas celulares (U937 y Raji) (derecha). El estado de metilación de los promotores se muestra en un cuadro a la izquierda (rojo indica metilado y verde no metilado). La muestra *Input* (DNA total, control positivo) va seguida de la fracción unida al control negativo Nab (*No antibody*) y de las fracciones unidas a cada una de las cuatro MBD.

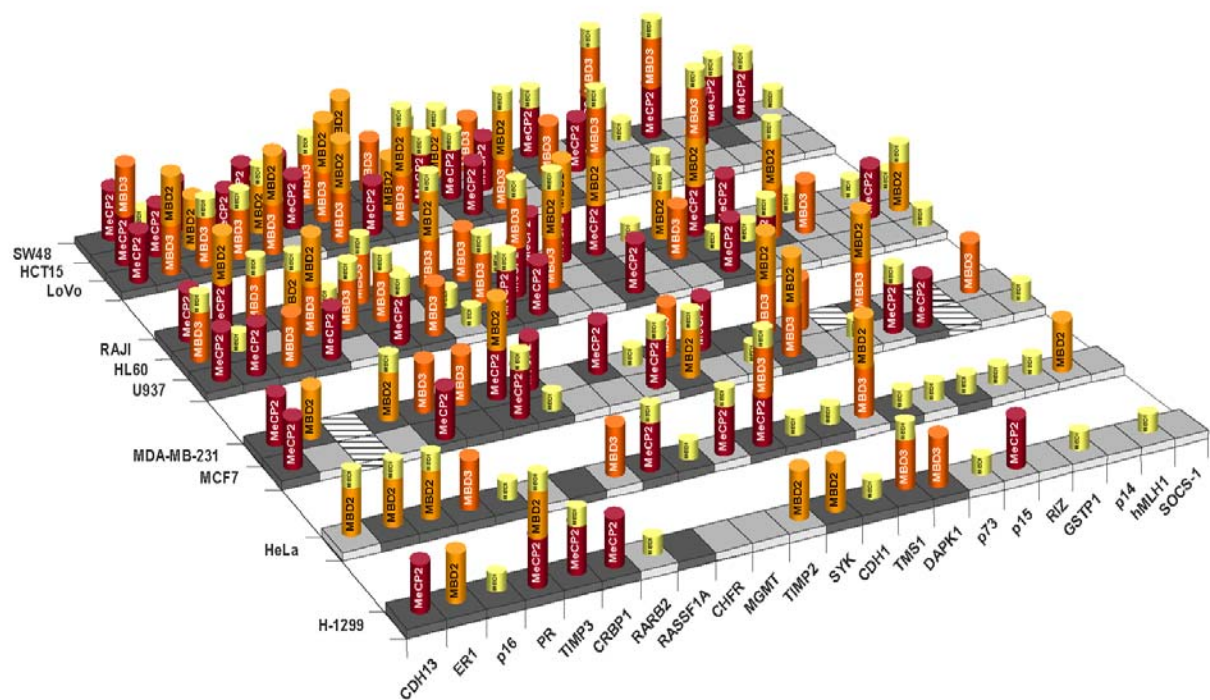


Figura 14. Perfil de unión de proteínas MBD a 22 islas CpG de genes implicados en la aparición y desarrollo tumorales en 10 líneas celulares de cáncer humano. La base de la figura muestra el estado de metilación de las islas CpG, los cuadrados oscuros indican metilación y los claros no metilación. Los cuadros rayados indican delección homocigótica. Las líneas están organizadas por tipo tumoral con una línea vacía entre los diferentes tipos. La presencia de proteínas MBD se representa con cilindros coloreados: MeCP2 en granate; MBD1 en amarillo; MBD2 en naranja oscuro y MBD3 en naranja claro.

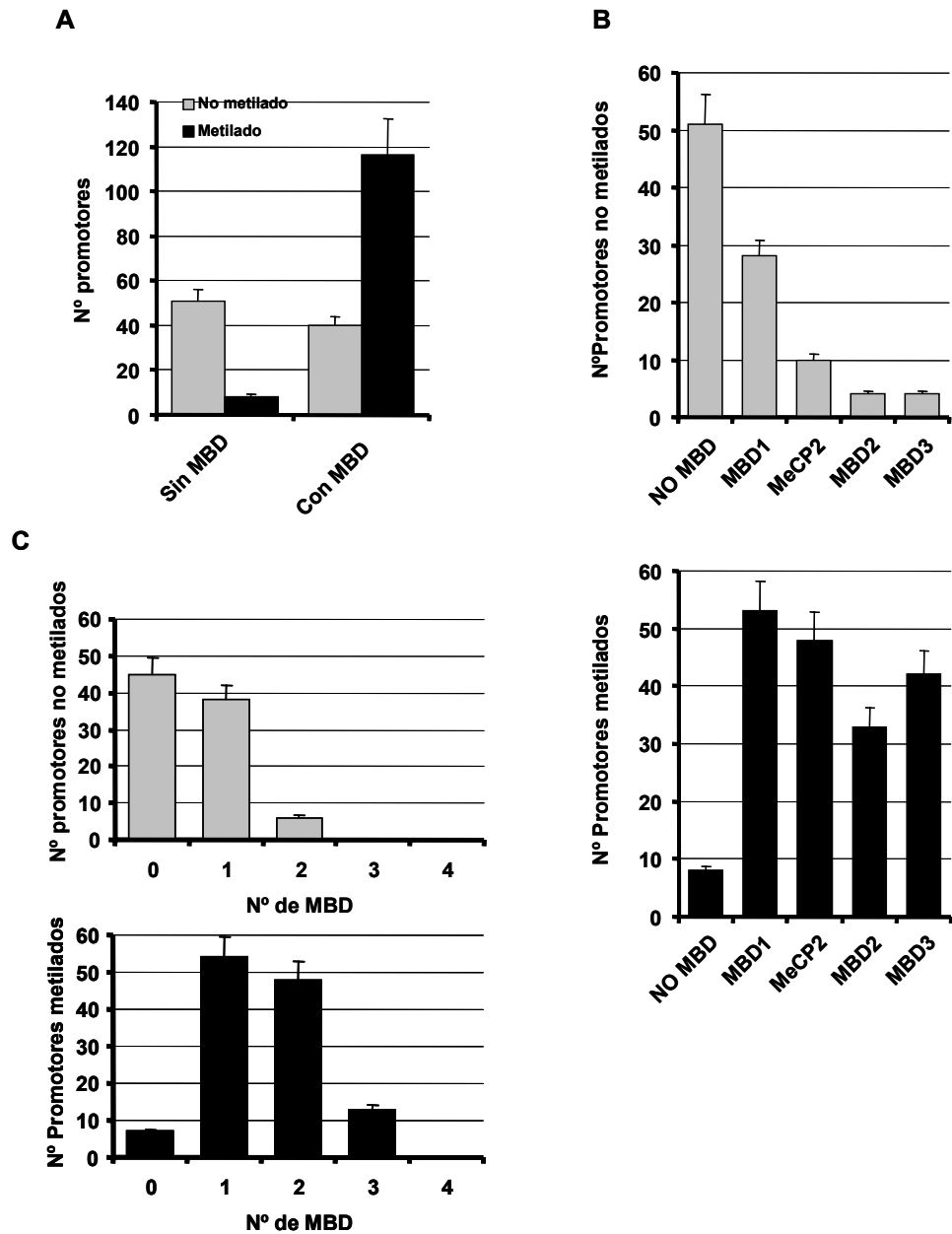


Figura 15. Ocupación de promotores metilados y no metilados por proteínas MBD. A) Ocupación de promotores metilados y no metilados. B) Proteínas MBD que ocupan promotores metilados y no metilados. C) Número de proteínas MBD en promotores metilados y no metilados.

Se plantea otra cuestión interesante a partir de estos datos que es qué sucede con el 11% de las islas CpG metiladas en las que no se ha

encontrado ninguna MBD unida. Una de las explicaciones más plausible es la existencia de otros represores transcripcionales con afinidad por el dinucleótido CpG metilado que no han sido incluidos en este estudio, como nuevos miembros de la familia MBD (Roloff *et al.*, 2003), la glicosilasa de DNA MBD4 (Kondo *et al.*, 2005), la proteína de unión a DNA metilado Kaiso (Prokhortchouk *et al.*, 2001) o las proteínas similares a Kaiso ZBTB4 y KBTB38 (Filion *et al.*, 2006), y que podrían estar excluyendo a las proteínas MBD estudiadas de los promotores.

Por lo tanto, el análisis de la distribución de las proteínas MBD en un panel de 22 genes y 10 líneas celulares de cáncer humano corrobora la unión preferencial de estas proteínas a promotores hipermetilados, mientras que los promotores no metilados no aparecen ocupados por ninguna MBD o están ocasionalmente ocupados por MBD1 (figura 15B).

Si se analiza la distribución de las proteínas MBD en cada uno de los promotores del estudio se observa que para MeCP2 y MBD2 el perfil de unión es significativamente específico de promotor (test no paramétrico de Kruskal-Wallis, $p=0.011$), sin embargo, para MBD1 y MBD3 no encontramos especificidad alguna. Por ejemplo, en la isla CpG del gen CDH13, que está metilada en todas las líneas celulares incluidas en este trabajo excepto en HeLa, aparece MeCP2 unida en todos los casos en los que el promotor está metilado excepto en HL60 (8 de 9). Sin embargo, este es un caso excepcional, ya que no todos los promotores presentan esta relación tan inequívoca en la unión de proteínas MBD. Así, observamos que los promotores de los genes PR y ER1 muestran una mayor heterogeneidad en la distribución de proteínas MBD a lo largo del panel de líneas: en el promotor del gen PR encontramos unida MeCP2 en 3 de las líneas celulares (H1299, U937 y HCT15), MBD1 en cuatro (H1299, MDA-MB-231, Raji y LoVo), MBD2 también en cuatro ocasiones (H1299, MDA-MB-231, HL60 y Raji) y MBD3 en 3 (HeLa, HL60 y LoVo). En el promotor del gen ER1 aparecen MeCP2 y MBD1 en 3 ocasiones cada una (MeCP2 en U937, Raji

y HCT15, y MBD1 en HeLa, HL60 y SW48), MBD2 unida a este promotor en cinco de las líneas celulares (H1299, HeLa, MDA-MB-231, Raji y LoVo) y MBD3 en una (LoVo), dándose una unión múltiple en algunos casos, como se puede observar en estos genes.

Los datos obtenidos indican que aquellos genes que aparecen metilados en un alto porcentaje de líneas celulares exhiben más especificidad en el reclutamiento de proteínas MBD que aquellos que aparecen metilados con menor frecuencia. Por ejemplo, CHFR, que aparece metilado en 7 de las 10 líneas aparece ocupado por MBD3 en 5 de estas 7 líneas. MGMT, donde en todas las líneas en las que aparece metilado (7 de 7) encontramos MeCP2 y/o MBD1 unidas o CDH13, que está metilado en 9 de las 10 líneas y MeCP2 está presente en 8 de estos 9 casos.

En el caso de CDH13 cabe resaltar que los dinucleótidos CpG del promotor de CDH13 se encuentran rodeados por secuencias $[A/T] \geq 4$, que según Klose *et al.* (2005) son necesarias para la unión de MeCP2 a sitios metilados. Estos datos parecen indicar que la aparición de nuevos sitios para la unión de proteínas MBD debido a la hipermetilación aberrante de islas CpG da lugar a dianas específicas para alguna de las MBD al combinarse requisitos necesarios pero no suficientes para la unión efectiva de estas proteínas que no se daban antes de la hipermetilación del promotor.

Analizando la expresión de las MBD en cada línea celular de manera independiente observamos que algunas MBD se encuentran ocupando diferentes promotores de manera predominante en diferentes líneas celulares. Utilizando el test estadístico de Kruskal-Wallis, se observa que en cada línea celular hay una ocupación preferente por MeCP2 ($p=0.026$), MBD1 ($p<0.001$) y MBD3 ($p=0.020$), pero no por MBD2 ($p>0.05$). Así, para U937 y SW48 MeCP2 es la MBD que ocupa un mayor número de promotores, mientras que en H-1299 y HL-60 es MBD1 (figura 14). Esta ocupación de proteínas MBD en las diferentes líneas celulares podría deberse a las diferencias en los niveles de expresión. No obstante, al

comparar los datos de ocupación de las MBD de los diferentes promotores por ChIP en cada línea celular con los datos de expresión de proteína por *Western blot* observamos que, en general, la mayor expresión de una MBD particular en una línea celular determinada no está asociada con la ocupación mayoritaria de los promotores estudiados por esa MBD. Por lo tanto, el reclutamiento de proteínas MBD a secuencias diana podría deberse a la función específica de cada MBD y a la presencia de otros factores nucleares específicos de cada línea celular que interaccionarían con las MBD a través de complejos correpresores más que por la simple disponibilidad de las mismas. Por ejemplo, en la línea celular LoVo la proteína MBD que más se expresa es MBD1 y no se observa una ocupación preferente por parte de esta MBD en los promotores incluidos en el estudio. Sólo en la línea celular U937, que expresa de forma mayoritaria MeCP2, se observa una clara ocupación preferencial de los promotores por MeCP2, sin que esto signifique que esta sea debida a su mayor presencia en la célula.

1.3 La hipermetilación de las islas CpG de los genes analizados se asocia con silenciamiento transcripcional.

En todos los casos analizados, la hipermetilación de la isla CpG se asocia con silenciamiento transcripcional (tabla 1), como cabe esperar teniendo en cuenta que la metilación del DNA es reconocida por las MBD y otras proteínas de unión a DNA metilado que a su vez reclutan complejos correpresores modificadores de cromatina a los sitios metilados. Sólo en un caso se han detectado niveles bajos de expresión en un gen cuyo promotor se encuentra hipermetilado, TIMP3 en la línea MDA-MB-231. Esta expresión tan baja podría deberse a la existencia de una subpoblación de células en el cultivo en la que la isla CpG de este gen no se encuentre metilada.

En el caso de los genes cuyas islas CpG no se encuentran metiladas, en 23 de los 86 casos no se detectó expresión génica y de estos 23 casos, 10

estaban ocupados por MBD1 (SOCS-1 y DAPK1 en SW-48, SOCS-1 en Raji, SOCS-1 en HL60, SOCS-1 en U937, p15 y SOCS-1 en MCF7, RAR β 2 y p73 en H-1299 y CDH13 en HeLa). El resto de genes cuyos promotores no se encuentran metilados que no se expresan podrían estar silenciados por otros mecanismos de represión independientes de metilación. Existen casos de genes sin metilación en la región promotora en los que la unión de MBD1 no parece inhibir la expresión génica por lo que podríamos estar detectando la unión de alguna de las isoformas de MBD1 que carecen del tercer dominio CxxC. El dominio CxxC3 parece ser el implicado en la represión transcripcional independiente de metilación mediada por esta MBD (Fujita *et al.*, 2000).

Gen	Chr. Position	SW48			HCT15			LoVo			Raji			HL60		
		BS	MSP	RT	BS	MSP	RT	BS	MSP	RT	BS	MSP	RT	BS	MSP	RT
hMLH1	3p21.3	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+
MGMT	10q26	M	M	-	M	M	+/-	UM	UM	+	M	M	+/-	M	M	-
GSIP1	11q13	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
TIM2	17q25	M	M	+	M	M	+	M	M	+/-	M	M	+/-	M	M	-
TIM3	22q12.1-q13.2	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-
CDH1	16q22.1	UM	UM	-	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
CDH13	16q24.2	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	+/-	M	M	-
p16	9p21	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	UM	UM	+
p14	9p21	M	M	-	M	M	-	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+/-
p15	9p21	UM	UM	+	UM	UM	+/-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
RARB2	3p24	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	UM	UM	-
CRBP1	3p21-q22	M	M	-	M	M	-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
ER1	6q25.1	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-
PR	11q22	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-
CHFR	12q24.33	M	M	-	M	M	-	M	M	+	M	M	-	M	M	-
p73	1p36	M	M	-	UM	UM	+/-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
RASSF1A	3p21.3	M	M	+	M	M	+	M	M	+/-	M	M	-	M	M	+/-
RIZ	1p36	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-
SOCS-1	16p13.2	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	-
SYK	9q22	UM	UM	+	UM	UM	-	M	M	+/-	UM	UM	+	UM	UM	+
DAPK1	9p34.1	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
TMSI	16p12-p11.2	M	M	-	M	M	+/-	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+

Gen	Chr. Position	U937			MDAMB-231			MCF7			H1299			H1a		
		BS	MSP	RT	BS	MSP	RT	BS	MSP	RT	BS	MSP	RT	BS	MSP	RT
hMLH1	3p21.3	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+
MGMT	10q26	M	M	-	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-
GSTP1	11q13	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+
TIMP2	17q25	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-	M	M	+	UM	UM	+
TIMP3	22q12.1-q13.2	UM	UM	-	M	M	+/-	M	M	-	M	M	-	M	M	-
CDH1	16q22.1	M	M	-	M	M	-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
CDH13	16q24.2	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	UM	UM	-
p16	9p21	M	M	-	HD	HD	HD	HD	HD	HD	M	M	-	M	M	-
p14	9p21	UM	UM	+/-	HD	HD	HD	HD	HD	HD	UM	UM	+	UM	UM	+
p15	9p21	UM	UM	+	HD	HD	HD	UM	UM	-	UM	UM	+	UM	UM	+
RARE2	3p24	M	M	-	M	M	-	M	M	-	UM	UM	-	M	M	-
CRBP1	3p21-q22	M	M	-	M	M	-	M	M	+/-	M	M	-	UM	UM	+/-
ERI	6q25.1	M	M	-	M	M	-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-
PR	11q22	M	M	-	M	M	-	UM	UM	-	M	M	-	M	M	-
CHFR	12q24.33	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-
p73	1p36	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+	UM	UM	-	M	M	+/-
RASSF1A	3p21.3	UM	UM	+	M	M	+/-	M	M	-	M	M	+/-	UM	UM	+
RIZ	1p36	UM	UM	+/-	M	M	-	UM	UM	+	UM	UM	+	M	M	-
SOCS-1	16p13.2	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	-	UM	UM	-
SYK	9q22	UM	UM	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-	M	M	-
DAPK1	9q34.1	UM	UM	+/-	M	M	-	M	M	+/-	M	M	-	UM	UM	-
TMS1	16p12-p11.2	UM	UM	+	M	M	-	UM	UM	+	M	M	-	M	M	-

Tabla 1. Datos de metilación y de expresión génica de los 22 genes implicados en cáncer incluidos en el estudio en 10 líneas celulares de cáncer humano. La metilación se analizó por secuenciación genómica (BS) y por PCR específica de metilación (MSP). La expresión de los genes se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa (RT). Se indica también la posición cromosómica de cada gen analizado. U, no metilado; M, metilado; HD, delección homocigota. Los genes están organizados por función biológica.

Análisis de los efectos de la eliminación de las proteínas MBD sobre la expresión génica y la estructura de la cromatina

Las proteínas MBD están implicadas en el silenciamiento transcripcional dependiente de metilación mediante el reclutamiento de actividades modificadoras de la cromatina a las secuencias de DNA metiladas. Por lo tanto, la eliminación de las MBD mediante interferencia de los RNA mensajeros (siRNA) debe de tener efectos sobre la estructura de la cromatina y la expresión génica.

2.1 Inhibición de la expresión de las proteínas MBD mediante siRNA.

Empleando la técnica de interferencia de RNA (Quiagen) se redujeron los niveles de MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 de forma individual, en combinaciones de dos (MeCP2 y MBD1, MeCP2 y MBD2, MBD1 y MBD2) y MeCP2, MBD1 y MBD2 a la vez en células HeLa.

La eficiencia de la interferencia mediante siRNA de las distintas MBD fue comprobada por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3, como control de carga se utilizó β -actina (figura 16A). Como se observa en la figura, los niveles de las proteínas interferidas en cada caso disminuyeron de manera significativa respecto al control (células transfectadas con oligonucleótidos aleatorios). También se comprobó el descenso efectivo en los niveles de mRNA mediante RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa (figura 16B y 16C). Como se puede observar, los niveles de RNA mensajero disminuyeron tras la transfección de los siRNA en todos los casos.

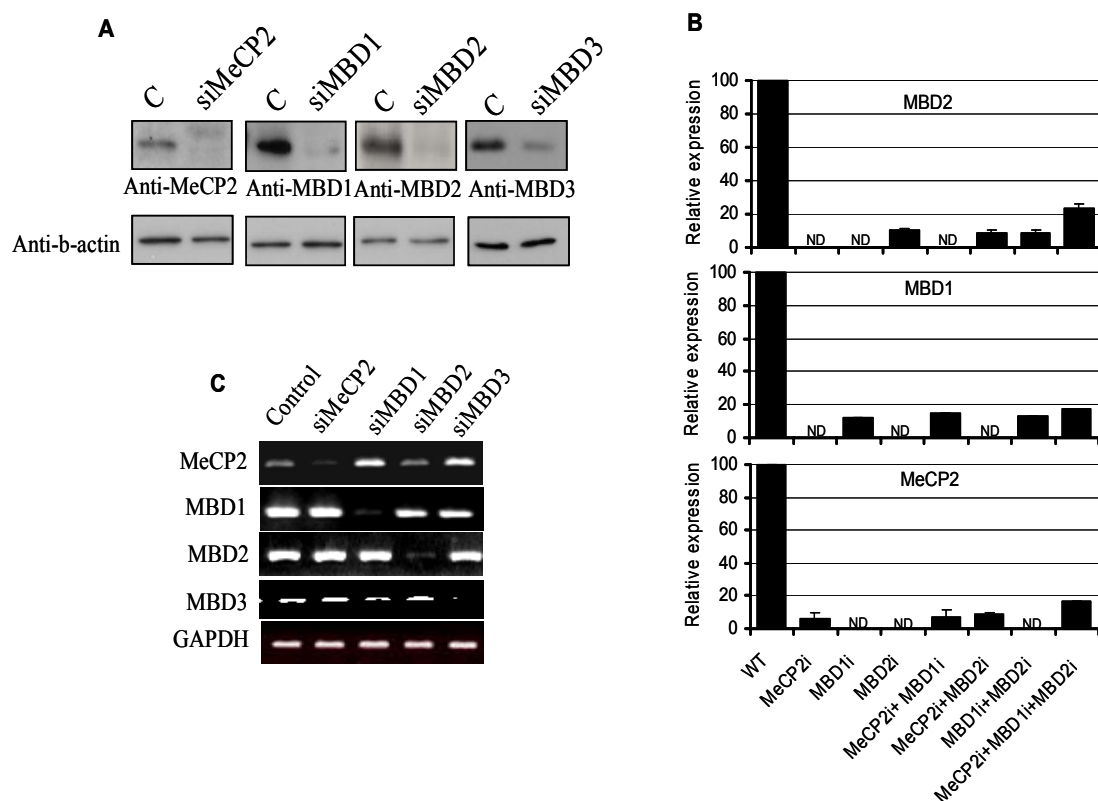


Figura 16. A) Análisis de los niveles de expresión mediante *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen específicamente MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3. Como control de carga se utilizó anti-beta-actina. B) Análisis de los niveles de RNA mensajero de las MBD por RT-PCR semicuantitativa. Como control de carga se analizaron los niveles de GAPDH. C) Análisis de los niveles de RNA de MeCP2, MBD1 y MBD2 tras la interferencia individual y tras las interferencias combinadas MeCP2/MBD1, MeCP2/MBD2, MBD1/MBD2 y MeCP2/MBD1/MBD2 por RT-PCR cuantitativa. ND: No determinado.

2.2 La eliminación de las proteínas MBD por siRNA da lugar a una estructura de la cromatina asociada a activación transcripcional.

Las proteínas MBD reprimen la transcripción génica de forma dependiente de la metilación mediante el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina a los sitios metilados. La depleción de las proteínas MBD elimina uno de las piezas implicadas en la interpretación de

la señal de metilación del DNA por lo que las marcas de las histonas y por lo tanto la estructura de la cromatina se podrían ver afectadas.

Para estudiar los efectos de la eliminación de las MBD sobre las modificaciones de histonas, se aislaron histonas mediante extracción ácida con HCl 0.25M de las muestras en las que previamente se habían eliminado las proteínas MBD y se analizaron los niveles globales de acetilación de H3 y H4 por HPCE (*High Performance Capillary Electrophoresis*).

La separación de las especies acetiladas de H3 y H4 por HPCE da lugar a un perfil característico para cada una de las dos histonas analizadas. El registro de H3 produce un perfil de 4 picos que se corresponden con cada uno de los posibles estados de acetilación (sin acetilar, monoacetilada, diacetilada y triacetilada). En el caso de la histona H4 el registro muestra 4 picos asociados a los estados de acetilación pero forman un doblete, la cuantificación de la acetilación requiere por tanto de la suma de los dos picos de cada doblete que se corresponden al mismo estado de acetilación.

Los datos de acetilación para H4 obtenidos mediante HPCE fueron consistentes y reproducibles para cada una de las muestras tras la eliminación de las proteínas MBD. Los niveles globales de acetilación de la histona H4 aumentan al eliminar MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 de forma individual. También se midieron los niveles globales de acetilación de H4 tras eliminar HDAC2 por siRNA para compararlos con los efectos provocados por la eliminación de las proteínas MBD (figura 17). HDAC2 es una histona desacetilasa que aparece en la célula formando complejos correpresores de la transcripción que son reclutados por las MBD a los sitios metilados. Los cambios en los niveles de acetilación observados al eliminar HDAC2 están en el mismo rango que los que se producen tras eliminar las proteínas MBD, es decir, los niveles globales de acetilación de la histona H4 se ven afectados de manera similar al eliminar las diferentes proteínas MBD que al eliminar HDAC2. Por tanto, estos datos apoyan el modelo según el cual las proteínas MBD interpretan la señal represora codificada por la

metilación del DNA al reclutar complejos con actividad correpresora, entre ellas la actividad histona desacetilasa de las HDAC, a los sitios metilados.

La interferencia de MeCP2 es la que produce un mayor efecto sobre la acetilación global de H4 en comparación con la eliminación de las demás MBD, este aumento global de la acetilación de H4 se ve reflejado tanto en el aumento de las formas monoacetiladas como de las formas diacetiladas y triacetiladas. Es más, la eliminación de MeCP2 produce un aumento mayor de los niveles de acetilación de H4 que la eliminación de HDAC2. Este hecho llama la atención porque el mecanismo represor mediado por MeCP2 implica el reclutamiento del complejo Sin3a, del que forma parte HDAC2 por lo que *a priori* cabría esperar un aumento de los niveles de acetilación similar pero nunca superior al obtenido si el complejo Sin3A dejara de ser funcional en su totalidad. No obstante, el complejo Sin3A contiene también HDAC1 y, aunque con menor eficiencia por la ausencia de HDAC2, podría seguir siendo funcional ya que se ha observado que HDAC1 tiene en muchos contextos una actividad redundante a la de HDAC2 y puede sustituirla en la formación del complejo. La eliminación de MeCP2 en nuestro modelo provocaría que el complejo Sin3A, aunque permaneciera intacto en la célula, no pueda ser reclutado eficientemente a la cromatina por lo que la acetilación global subiría de forma más drástica que eliminando sólo una de las dos HDAC que forman el parte del complejo Sin3A.

En cuanto a la eliminación de MBD1, esta da lugar a un aumento de los niveles de mono- y triacetilación de H4, sin embargo, los niveles de diacetilación disminuyen respecto al control. En el caso de MBD2, la interferencia por siRNA da lugar a una subida de los niveles de mono- y diacetilación de H4, mientras que los niveles de triacetilación bajan respecto al control. Para MBD3 se repiten los patrones observados para MBD1, descienden los niveles de diacetilación mientras que aumentan los de mono- y triacetilación.

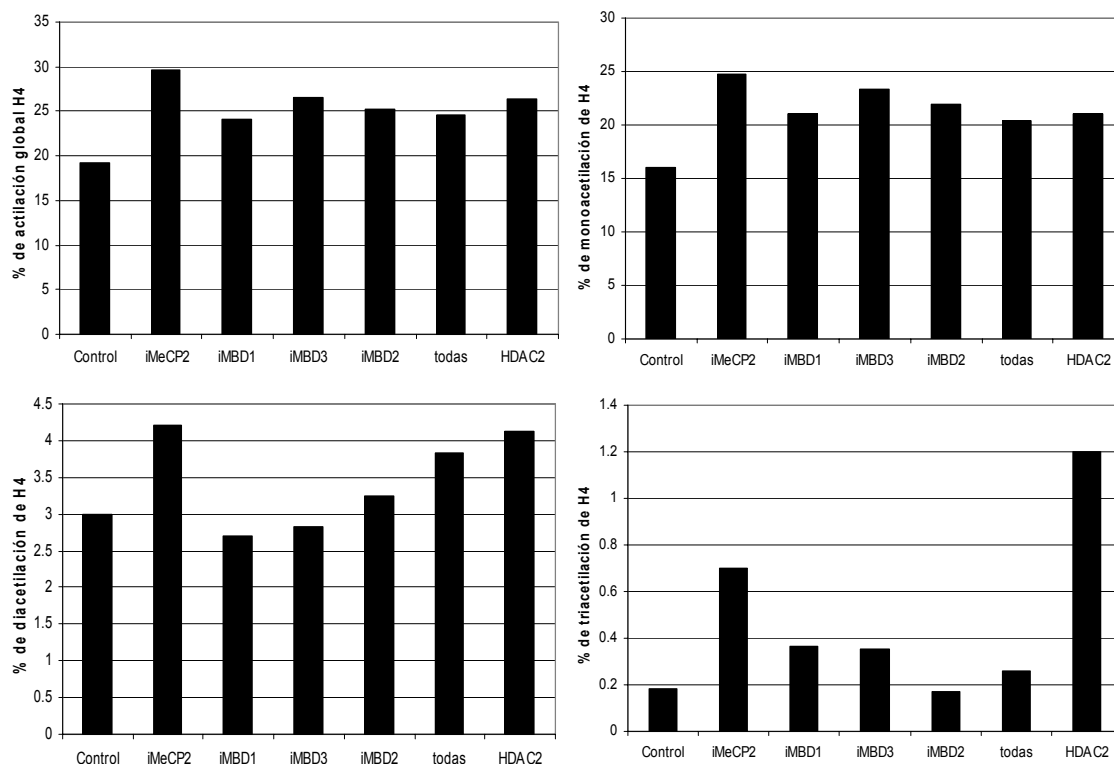


Figura 17. Niveles de acetilación global, mono-, di- y trimetilación de la histona H4 por HPCE (*High Performance Capillary Electrophoresis*) tras la eliminación de las proteínas MeCP2, MBD1 y MBD2 de forma individual, combinadas de dos en dos y las tres simultáneamente en la línea celular HeLa.

Los datos de acetilación global de la histona H3, sin embargo, no fueron muy fiables por la poca cantidad de muestra que se obtiene a partir de la purificación en el HPLC (*HighPerformance Liquid Cromatography*)..

El análisis de acetilación por HPCE, aunque es una herramienta muy importante para el análisis de cambios globales de acetilación, no nos dice nada sobre la posición exacta de los residuos de lisina de las colas N-terminales de las histonas donde se dan los cambios observados. Por este motivo se analizaron las mismas muestras de histonas por *Western blot* utilizando anticuerpos contra acetil-lisina 16 de H4 (AcK16H4), acetil-lisina 8 de H4 (AcK8H4), acetil-lisina 5 de H4 (AcK5H4) y acetil-lisina 12 de H4 (AcK12H4) (figura 18). No se observan grandes cambios en los niveles de

acetilación global de la histona H4 tras la eliminación de las proteínas MBD, aunque sí se detecta un ligero aumento cuando se elimina MeCP2 o MBD1. Esto puede ser debido a que el anticuerpo utilizado para estudiar los niveles de acetilación global de H4 por *Western blot* fue obtenido utilizando un péptido sintético tetra-acetilado (acetilado en las lisinas del péptido equivalentes a las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histonaH4). Este anticuerpo es policlonal y, aunque puede estar también reconociendo las formas mono-, di- y tri-acetiladas, mayoritariamente reconoce las formas tetra-acetiladas, por lo que los cambios observados por *Western blot* corresponden principalmente a transiciones entre esta forma y el resto de grados de acetilación. No obstante, según se deduce de los datos obtenidos por HPCE, los cambios de acetilación más grandes que se observan son transiciones entre formas no acetiladas y monoacetiladas, cambios que no tienen por qué ser detectados mediante el uso de este anticuerpo y que explicarían por qué los datos de *Western blot* con el anticuerpo contra acetilación global de H4 no reflejan los cambios observados mediante HPCE.

Si se analizan las posiciones específicas de acetilación de H4 observamos que, en general, aumentan las marcas asociadas a activación génica. Así, se observa un aumento de la acetilación de la lisina 5 de H4, asociada con activación. La acetilación de la lisina 8 también aumenta al eliminar cualquiera de las proteínas MBD, siendo el aumento provocado por MeCP2 el más modesto. Sin embargo, se observa un descenso en la acetilación de la lisina 12 de la histona H4 cuyo significado no queda claro en este contexto de activación de la transcripción. La acetilación de la lisina 16 de H4 aumenta sólo tras la eliminación de MBD3. Los efectos sobre la cromatina de esta marca son complejos de analizar pues se asocia con diferentes eventos en función del contexto en que se encuentre y del estado de acetilación de los residuos adyacentes (Zhou y Grummt, 2005; Carmen *et al.*, 2002).

Según se observa por *Western blot*, los niveles de acetilación globales de H3 aumentan tanto al eliminar MBD2 y MBD3 como al eliminar MBD1, aunque la eliminación de esta última produce unos cambios en los niveles de acetilación de la histona H3 mucho menores que los observados para MBD2 y MBD3. La eliminación de MeCP2 no parece provocar ningún cambio en el estado de acetilación global de H3, aunque esto no quiere decir que no se puedan estar produciendo cambios en el estado de acetilación de residuos concretos como los observados para la histona H4, ya que el anticuerpo contra acetilación global de la histona H3 es también policlonal y fue obtenido utilizando un péptido sintético diacetilado (acetilado en las lisinas del péptido correspondientes a las lisinas 9 y 14 de la histona H3).

Al analizar las modificaciones de metilación sobre residuos específicos de lisina de la histona H3 se observa en general un desplazamiento hacia patrones de modificaciones asociados a activación transcripcional cuando se eliminan las proteínas MBD, sobre todo cuando se interfiere MBD2 y MBD3. Así, la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3, que está asociada con la activación transcripcional, aumenta de manera muy notoria tras la eliminación de MBD3 y también, aunque en menor proporción, al eliminar MBD1 y MBD2. La dimetilación de la lisina 4 de H3 desciende tras la eliminación de cualquiera de las proteínas MBD respecto al control. En el caso de la lisina 9 observamos que los niveles de trimetilación, asociados con represión transcripcional, permanecen igual que en el control tras la eliminación de MeCP2 y MBD1 mientras que la eliminación de MBD2 y MBD3 da lugar a un descenso de la trimetilación en este residuo.

De estos resultados podemos concluir no sólo que las MBD actúan de manera pasiva en el silenciamiento de la transcripción mediante el reconocimiento de la metilación del DNA, sino que están mediando en la interpretación de la señal de metilación del DNA y ejerciendo un papel

activo a través del reclutamiento de enzimas modificadoras de las histonas a las secuencias metiladas. Este reclutamiento se ve reflejado de manera indirecta en los cambios observados en las modificaciones de las histonas al eliminar las proteínas MBD, tanto por HPCE como por *Western blot*. El hecho de que los cambios más drásticos se produzcan tras la eliminación de MBD3 puede explicarse si tenemos en cuenta que MBD3 forma parte del complejo correpresor Mi-2/NuRD, que es reclutado a secuencias metiladas por otros factores represores como MBD2. La eliminación de MBD3 posiblemente esté dando lugar a la desestabilización del complejo encargado de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales en los extremos de las histonas que determinarán un estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina, mientras que la eliminación de cualquiera de las otras proteínas MBD da lugar a cambios menos drásticos por su posible papel redundante.

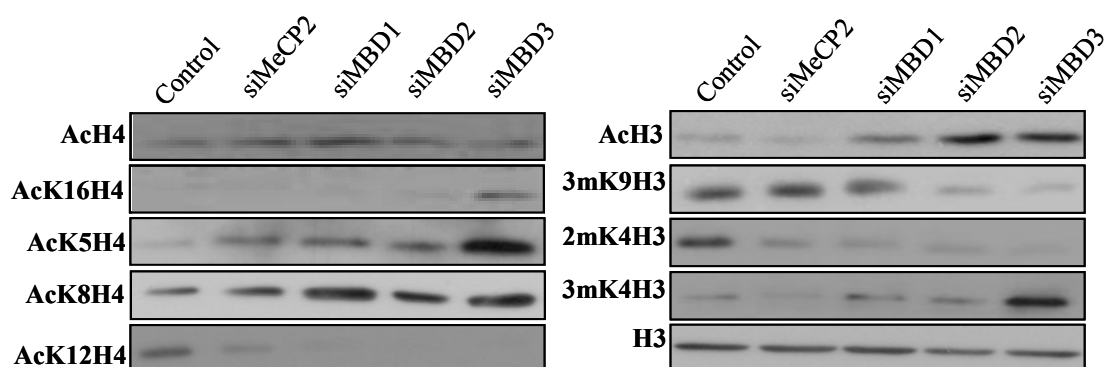


Figura 18. Análisis por *Western blot* de modificaciones de histonas en residuos específicos relacionadas con el control de la transcripción génica. Se analizaron también los niveles de acetilación global de las histonas H3 y H4. Como control de carga se analizaron los niveles de la histona H3.

2.3 La eliminación de las proteínas MeCP2, MBD1 y MBD2 da lugar a sobre-expresión génica en células HeLa.

Los cambios producidos en el patrón de expresión génica tras la eliminación de las MBD se estudiaron utilizando la tecnología de análisis de

expresión global mediante *microarray*. Se analizaron sólo los efectos de la eliminación de MeCP2, MBD1 y MBD2 para determinar el papel del dominio MBD en la regulación transcripcional. Al carecer MBD3 de un dominio MBD funcional no se analizaron los efectos de su interferencia en el *microarray* de expresión. El RNA total extraído de las células transfectadas con los siRNA contra las proteínas MBD fue hibridado en un *microarray* de expresión utilizándose como referencia células transfectadas con oligonucleótidos aleatorios. La plataforma utilizada fue el *CNIO Oncochip*.

El *CNIO Oncochip* es un *microarray* de cDNA diseñado especialmente para estudiar genes implicados en cáncer que contiene un núcleo de 2.489 genes relevantes en cáncer así como genes implicados en la respuesta a fármacos, genes específicos de tejidos y genes implicados en el control del ciclo celular y apoptosis. Hay un total de 6.386 genes representados por 7.237 clones. Los clones de cDNA humanos son clones de secuencias confirmadas por I.M.A.G.E., incluyendo 5.253 clones de genes conocidos, y los 1.984 restantes representan etiquetas de secuencias expresadas (EST). La lista completa de genes del *microarray* se puede encontrar en la dirección de internet: <http://bioinfo.cnio.es/data/oncochip>.

Lo primero que se observa es que el número de genes sobre-expresados es mayor cuando se interfieren MeCP2, MBD1 y MBD2 simultáneamente (922 genes sobre-expresados) que cuando se elimina la expresión de MeCP2, MBD1 y MBD2 de forma individual. Analizando las interferencias de las MBD de forma individual observamos que la depleción de MBD2 es la que produce la sobre-expresión de genes más numerosa (913 genes) siendo la interferencia de MeCP2 la que menos cambios de expresión produce (184). La interferencia de MBD1 da lugar a la sobre-expresión de 265 genes. Esto podría indicar que la proteína MBD2 tiene mayor importancia en la interpretación de la metilación del DNA que MeCP2 y MBD1 en células HeLa (figura 19).

Muchos de los genes sobre-expresados tras eliminar las proteínas MBD corresponden a genes que codifican proteínas ribosómicas, así, tras la eliminación simultánea de MeCP2, MBD1 y MBD2 el 10% de los genes sobre-expresados (95 de 922) corresponden a proteínas ribosómicas. Los promotores de estos genes no están metilados por lo que cabe pensar que el aumento de la expresión es la respuesta de la célula sintetizando ribosomas para procesar los nuevos RNA mensajeros que se producen como consecuencia del aumento del nivel de expresión global tras la eliminación de las MBD.

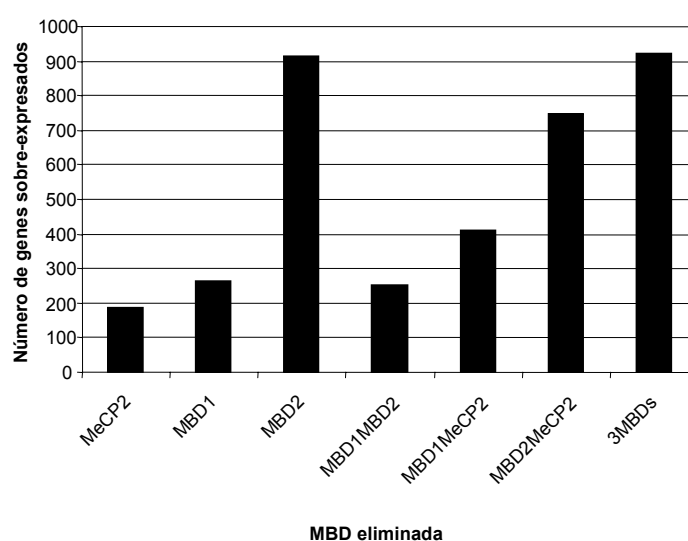


Figura 19. Número de genes sobre-expresados tras cada una de las interferencias.

Además se puede observar que mientras que MBD1 y MeCP2 comparten una elevada proporción de genes sobre-expresados cuando son eliminadas de forma individual, MBD2 regula un grupo de genes distintos (figura 20). A partir del análisis de los datos de expresión del *microarray* se obtiene un dendrograma donde se agrupan por un lado las interferencias individuales de MeCP2 y MBD1 así como la interferencia doble de MeCP2 y MBD1, y por otro los experimentos en los que se ha interferido MBD2, ya sea individualmente o a la vez que MeCP2. La interferencia doble de MBD1

y MBD2 da lugar a un patrón de sobre-expresión que queda equidistante respecto a las otras dos ramas.

Como ya se ha mencionado, el mayor número de genes sobre-expresados se observa al eliminar MBD2. Comparando este resultado con los datos obtenidos del análisis de los cambios en las modificaciones de histonas tras la eliminación de las diferentes MBD, se puede deducir que las modificaciones post-traduccionales de las histonas que juegan un papel más relevante en la regulación de la transcripción génica son los cambios en los niveles de tri-metilación de las lisinas 4 y 9 de la histona H3 como ya apunta Kouzarides (2007) en oposición a los cambios en la acetilación de la histona H4. Los cambios de metilación de la histona H3 se dan en mayor medida tras la eliminación de las proteínas MBD2 y MBD3, mientras que los mayores cambios en la acetilación de la histona H4 se dan tras la eliminación de McCP2, lo cual, como se deduce de los datos de expresión del *microarray*, no tiene un impacto tan marcado en la sobre-expresión de genes. En cualquier caso, el porcentaje del genoma que corresponde a secuencias codificantes es mucho menor que el que corresponde a secuencias repetitivas y endoparásitas, regiones heterocromáticas en donde se encuentran las proteínas MBD de forma mayoritaria. Por lo tanto, la relación entre los cambios globales en las modificaciones de histonas estudiados y la re-expresión de genes observada no tienen por qué tener un vínculo directo, pudiendo MBD2 dar lugar a cambios mayores en el patrón de expresión de los genes porque se encuentre regulando específicamente secuencias codificadoras sin provocar cambios en otras partes del genoma.

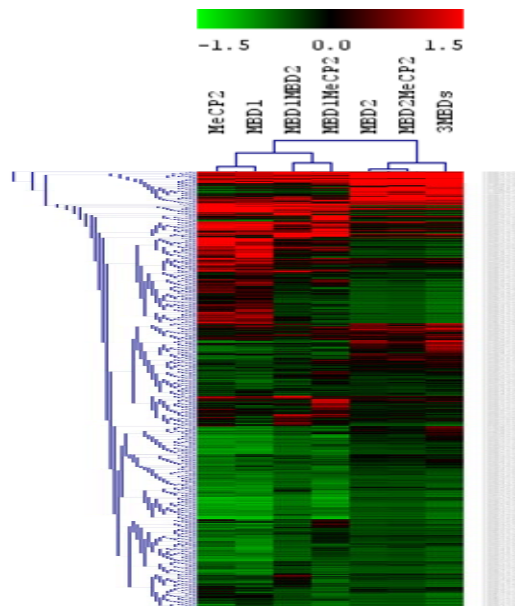


Figura 20. Dendrograma obtenido a partir de la agrupación de los genes sobre-expresados en cada uno de los experimentos de siRNA. MBD2 parece regular un grupo de genes distinto al regulado por MBD1 y MeCP2.

En todos los ensayos de interferencia llevados a cabo, tanto interferencias individuales como combinadas, el número de genes cuya expresión no se vio alterada es mayor que el número de genes sobre-expresados. Hay que tener en cuenta, además del hecho de que la propia tecnología empleada, así como las condiciones establecidas en el análisis estadístico, ya eliminan un gran número de genes que pueden estar siendo regulados por las MBD, que en este grupo se incluyen aquellos genes que carecen de islas CpG en sus secuencias promotoras y que por tanto no están regulados por proteínas MBD.

Además, existe un pequeño porcentaje de genes cuya expresión disminuye al eliminar las proteínas MBD. Podría tratarse de genes afectados indirectamente por la eliminación de las MBD, es decir, genes regulados por genes que sí hayan visto su expresión alterada al eliminar las proteínas MBD (tabla 2).

MeCP2	MBD1	MBD2	MBD1MBD2	MBD1MeCP2	MBD2MeCP2	3MBDs
184	264	913	250	408	748	922
175	256	911	242	406	743	919
9	8	2	8	2	5	3
1700	1620	971	1634	1476	1136	962

Tabla 2. De arriba abajo, número total de genes cuya expresión génica se vio alterada en cada uno de los ensayos de interferencia indicados, número de genes sobre-expresados, número de genes reprimidos y número de genes sin cambios de expresión tras la eliminación de las proteínas MBD individualmente o en las combinaciones indicadas.

2.4 Análisis de metilación de los genes sobre-expresados.

A partir de los datos de *microarray* se seleccionaron los 30 genes más sobre-expresados tras la interferencia de las tres proteínas MBD simultáneamente y se secuenciaron las islas CpG tanto en HeLa como en linfocitos normales modificados con bisulfito sódico para determinar el estado de metilación. Los genes secuenciados y su estado de metilación se muestran en la tabla 3.

Las islas CpG del 37% de los genes analizados (11 de 30) se encuentran hipermetiladas en HeLa. De estos 11 genes 5, TUBA-2, QKI, CJB3, TSSC4 y KRT14, se encuentran metilados también en linfocitos normales por lo que podría tratarse de genes regulados por metilación específica de tejido. Otro de los genes metilados tanto en HeLa como en linfocitos normales es IGF2. Este dato nos sirve como control ya que se trata de un gen imprintado y por lo tanto regulado por metilación en tejidos no tumorales. Los 5 genes restantes, FGF19, PARVG, COL11A2, LTBP3 y PTPRN, aparecen metilados sólo en HeLa por lo que la hipermetilación de estas islas CpG podría considerarse aberrante y por tanto estar implicada en el desarrollo del cáncer.

Nombre	Acc number	HeLa	NL
CSDA	NT_009714	UM	UM
COL11A2	NT_007592	M	UM
DDB1	NT_033903	UM	UM
DNAJB1	NT_011295	UM	UM
DOC-1R	NT_033903	UM	UM
FANCG	NT_008413	UM	UM
FGF19	NT_078088.	M	UM
GJB3	NT_032977	M	M
HXB	NT_008470	UM	UM
PTGS1	NT_008470	UM	UM
INHBB	NT_010755	UM	UM
KRT14	NT_010755	M	M
LTBP3	NT_033903	M	UM
MAT2A	NT_022184.	UM	UM
MSH5	NT_007592	UM	UM
p53R2	NT_008046.	UM	UM
PARVG	NT_011521	M	UM
PRDX5	NT_033903	UM	UM
PSMMD13	NW_001030877	UM	UM
PTP4A2	NT_032977	UM	UM
PTPRN	NT_005403	M	UM
QKI	NT_007422	M	M
SDHD	NT_033899	UM	UM
ST13	NT_011520	UM	UM
SUPT3H	NT_007592	UM	UM
TSSC4	NT_009237	M	M
TUBA2	NT_024524.	M	M
VIL2	NT_007422	UM	UM
WBP1	NT_022184.	UM	UM
IGF2	NW_001030877	M	M

Tabla 3. Listado de los genes cuyos promotores fueron secuenciados y datos de metilación en HeLa y linfocitos normales. (M) indica que el promotor se haya metilado y (UM) que se encuentra no metilado. Se muestra también el número de acceso en el NCBI.

Los 19 genes restantes analizados no están metilados ni en HeLa ni en linfocitos normales. Como ya se ha mencionado anteriormente, la sobre-expresión de estos genes no metilados podría deberse a que estén siendo regulados indirectamente por las MBD, es decir, que las MBD estén regulando algún gen implicado en la expresión de estos genes. Otra posibilidad es que exista una represión transcripcional mediada por proteínas MBD independientemente de la metilación, como se ha

demostrado en el caso de MBD1 a través de los dominios CxxC de unión a DNA (Fujita, 2000). Sin embargo, análisis por ChIP de los promotores de 5' de estos genes (SUPT3H, DNAJB1, PTGS1, DOC-1R y VIL2) no muestran unión de ninguna de las proteínas MBD estudiadas (figura 21).

Los genes cuyos promotores aparecen hipermetilados en HeLa y no metilados en linfocitos normales desempeñan funciones muy distintas en la célula. El gen FGF19 (*Fibroblast Growth Factor 19*) pertenece a la familia de los factores de crecimiento fibroblástico y está implicado en funciones fisiológicas tan diversas como angiogénesis, diferenciación celular, regulación metabólica, reparación tisular y oncogénesis (Nishimura *et al.*, 1999). PARVG (*γ-parvin*) codifica una proteína de la familia de proteínas relacionadas con alpha-actinina que median la adhesión celular a la matriz y la formación de contactos focales (Olski *et al.*, 2001). COL11A2 (*Collagen, type XI, alpha-2*) es un tipo de colágeno que forma parte de las fibras que forman el cartílago. Mutaciones en este gen se han relacionado con enfermedades como la condriodisplasia y la sordera (McGuirt, 1999). PTPRN (*Protein-Tyrosine Phosphatase Receptor-type N*) es una proteína con actividad fosfatasa. Las fosfatasas, junto con las quinasas, regulan funciones celulares como la proliferación y la transducción de señales, existiendo en la célula un equilibrio entre la actividad de las fosfatasas y las quinasas. Cuando este equilibrio se altera pueden originarse enfermedades como el cáncer. LTBP3 (*Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 3*) es una proteína que está involucrada en la formación de la matriz extracelular. Los TGF-beta son moléculas que tienen efectos tanto estimuladores como inhibidores del crecimiento de muchos tipos celulares y juegan un papel fundamental en la producción y degradación de la matriz extracelular y el gen LTBP3 regula la producción de estos factores.

Se secuenciaron los promotores de dichos genes en tejidos de cérvix (n=8), colon (n=2), pulmón (n=1), mama (n=1) no transformados para comprobar que la hipermetilación de las islas CpG de estos genes es una

característica que se da sólo en células tumorogénicas. En ningún caso se encontró hipermetilación del promotor de estos genes en tejido normal por lo que la metilación en estas secuencias parece ser una característica de las muestras tumorales (tabla 4).

Estos 5 genes fueron seleccionados para el análisis de metilación en otras líneas tumorales así como en tumores primarios ya que podrían estar involucrados en el desarrollo del cáncer. También se analizó la capacidad supresora de tumores de estos genes mediante la re-expresión en HeLa.

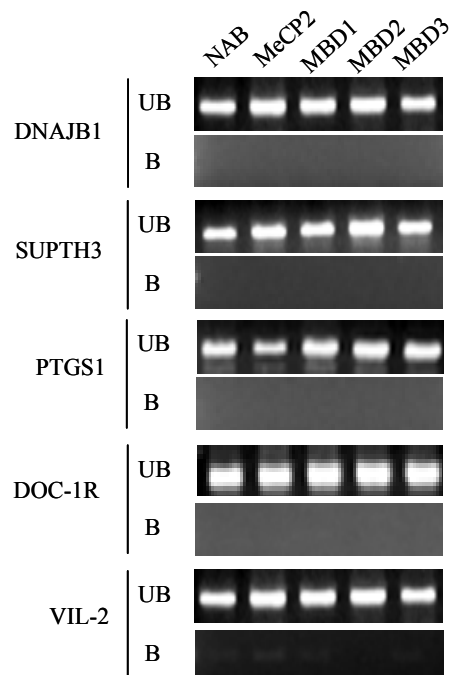


Figura 21. Estudio de la presencia de proteínas MBD en los promotores de cinco de los genes no metilados ni en HeLa ni en linfocitos normales. UB fracción no inmunoprecipitada por el anticuerpo (*Unbound*), B fracción inmunoprecipitada por el anticuerpo (*Bound*). NAB control negativo, muestra sin anticuerpo (*No Antibody*).

Gen	Localización	HeLa	Tejidos Normales*	Células sin MBDs*²
FGF19	11q13.1	M	U	M
COL11A2	6p21.3	M	U	M
PTPRN	2q35-q36.1	M	U	M
LTBP3	11q12	M	U	M
PARVG	22q13.31	M	U	M

* Tejidos normales incluye cérvix (n=8), colon (n=2), pulmón (n=1), mama (n=1) y linfocitos (n=1)

*² Células sin MBD incluye la eliminación de MeCP2, MBD1, MBD2 de forma individual y en combinaciones de dos así como la eliminación de las tres proteínas al mismo tiempo.

Tabla 4. Estado de metilación de los genes hipermetilados de forma aberrante en HeLa, en tejidos normales y en células HeLa en las que se ha eliminado la expresión de MeCP2, MBD1 y MBD2 individualmente y en combinaciones de dos así como todas simultáneamente. Las muestras de tejidos normales incluyen cérvix (n=8), colon (n=2), pulmón (n=1) y mama (n=1). U, no metilado; M metilado.

2.5 La hipermetilación de las islas CpG es independiente de la presencia de proteínas MBD.

El análisis por secuenciación de bisulfito de los promotores en células HeLa en las que las MBD habían sido interferidas indica que el estado de metilación del DNA no se ve alterado al eliminar la expresión de las MBD. Por lo tanto, la represión mediada por las proteínas MBD es un evento dependiente de metilación y las MBD no juegan aparentemente ningún papel en el establecimiento de los patrones de metilación del DNA (tabla 4). En la figura 22 se muestran las representaciones esquemáticas del

estado de metilación de dos de los promotores hipermetilados de forma aberrante en HeLa, en muestra de tejido cérvix no transformado y en células HeLa tras la interferencia de las MBD.

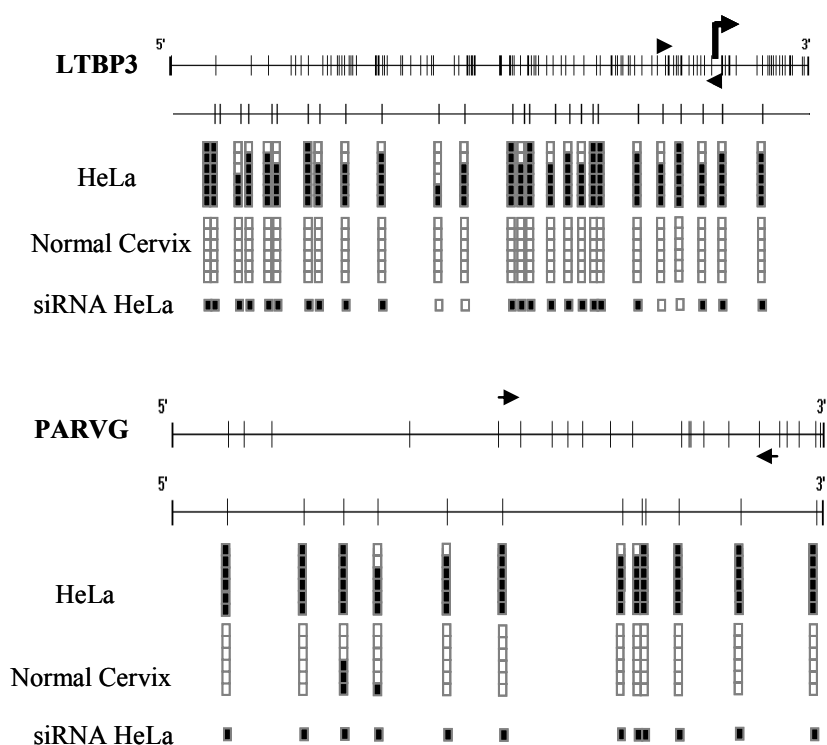


Figura 22. Secuenciación genómica de la isla CpG de dos de los cinco genes seleccionados en la línea celular HeLa y en tejido de cérvix no transformado (NC). Se representan seis clones de cada muestra. Se muestra también la metilación en las muestras en las que las MBD han sido interferidas. Los cuadrados negros indican metilación de la citosina en esa posición, los blancos no metilación. Las flechas pequeñas muestran la localización de los oligonucleótidos. La flecha gruesa indica el inicio de transcripción.

2.6 Las proteínas MBD se encuentran unidas a los promotores hipermetilados.

Tras observar que la eliminación de las MBD da lugar a la sobreexpresión de genes que se encuentran metilados, corroboramos la presencia de proteínas MBD en los promotores analizados por inmunoprecipitación de

cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos contra MeCP2, MBD1 y MBD2 (figura 23).

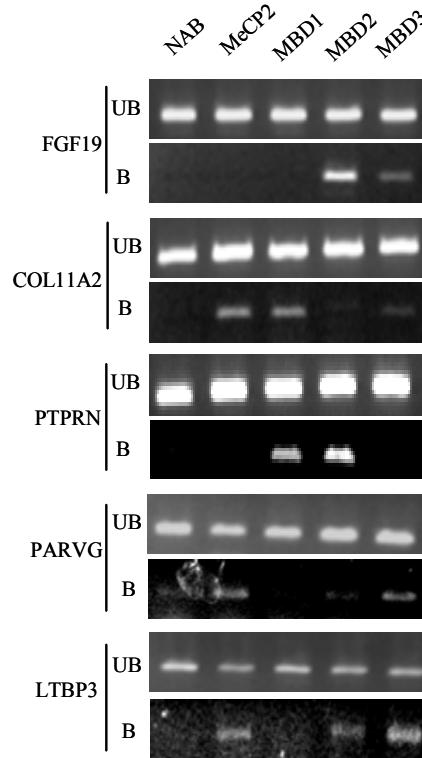


Figura 23. Ocupación por parte de las proteínas MBD de los promotores hipermetilados de forma aberrante en HeLa. UB fracción no inmunoprecipitada por el anticuerpo (*Unbound*), B fracción inmunoprecipitada por el anticuerpo (*Bound*). NAB control negativo, muestra sin anticuerpo (*No antibody*).

En los genes hipermetilados de forma aberrante en HeLa, el número de proteínas MBD unidas a los promotores es menor que en los promotores de los genes que se encuentran metilados tanto en HeLa como en tejidos normales. Así, en FGF19 aparecen MBD1 y MBD2, en COL11A2 MeCP2 y MBD1, en PTPRN MBD1 y MBD2, en PARVG MeCP2 y MBD3 y en LTBP3 MeCP2, MBD2 y MBD3 (figura 23). Mientras, en los genes analizados que se encuentran metilados tanto en HeLa como en linfocitos normales observamos la presencia de varias de las MBD en la misma isla CpG. Por ejemplo, en el promotor del gen QKI aparecen unidas MBD1,

MBD2 y MBD3, y en el de CJB3 MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 (figura 24). Esto podría deberse a que los genes que se encuentran metilados tanto en HeLa como en tejidos normales están silenciados mediante un mecanismo más preciso y complejo de regulación a través de metilación y proteínas MBD que funcionaría correctamente sobre estos promotores metilados de forma “natural” en oposición a un silenciamiento aberrante donde se podrían estar utilizando los mismos mecanismos pero de forma imprecisa. En cáncer, la aparición de nuevas dianas metiladas de manera aberrante deja disponibles nuevos sitios de unión para las MBD y cuál se una podría depender más de factores como la disponibilidad y abundancia de las distintas MBD en la célula (ya que se ha demostrado que al menos parcialmente tienen funciones redundantes y más aún en este tipo de procesos aberrantes) así como de otros cofactores nucleares junto a los que forman complejos, que de un mecanismo preciso y complejo de regulación equivalente al que seguramente se esté dando en las células normales con funciones específicas para cada MBD y sus isoformas. No obstante, por los niveles de expresión de las MBD que se observan por *Western blot* no podemos predecir el patrón de unión a secuencias hipermetiladas. aunque si se puede observar cierta tendencia como en el caso de U937, en donde la expresión mayoritaria de MeCP2 se ve reflejada en el perfil de ocupación de los promotores hipermetilados en esta línea celular, como ya se ha indicado anteriormente.

2.7 Las islas CpG hipermetiladas de forma aberrante en HeLa también se encuentran hipermetiladas en líneas celulares representativas de los tipos de cáncer humano más frecuentes.

Tras el estudio en células HeLa, se plantea la pregunta de si los promotores de estos genes están también hipermetilados en otros tipos de líneas celulares de origen tumoral. Para resolver esta cuestión, se analizó por secuenciación tras tratamiento con bisulfito sódico el estado de metilación

en otras líneas celulares de cáncer humano de cérvix (SiHa y CasKi), mama (MCF7 y MDA-MB-231), colon (LoVo, SW48, SW480, Colo205, RKO, HCT15 y HCT116), pulmón (K562 y K522), leucemias (HL60, REH, KG1a, MOLT-4, MOLT-16 y Jurkat) y linfomas (HUT78, Karpas y Raji) (tabla 5).

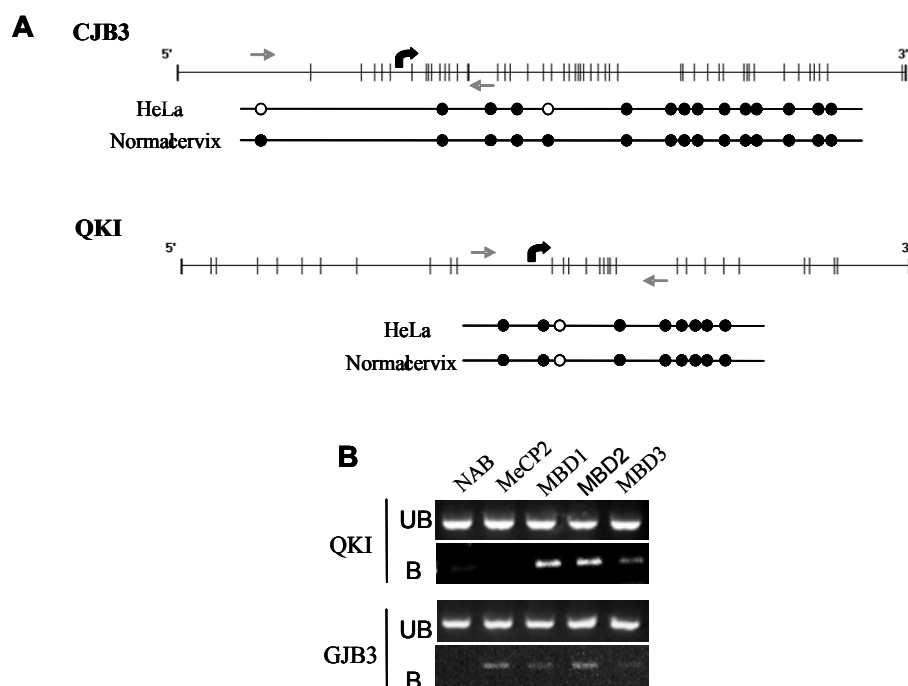


Figura 24. A) Representación esquemática del estado de metilación de las islas CpG de los genes QKI y GJB3 en HeLa, en tejido de cérvix normal. Los círculos negros indican que la citosina que ocupa esa posición se encuentra metilada y los blancos que se encuentra no metilada. B) Unión de proteínas MBD a los promotores de los genes QKI y GJB3 en HeLa. UB fracción no inmunoprecipitada por el anticuerpo (*Unbound*), B fracción inmunoprecipitada por el anticuerpo (*Bound*). NAB es el control negativo, muestra sin anticuerpo (*No Antibody*).

Los datos de metilación de los genes indican que COL11A2 es el gen que aparece metilado en un mayor número de líneas celulares (19 de 22), siendo LTBP3 el gen que aparece metilado en menor número de líneas (10 de 22). Si analizamos los datos de metilación en función del origen de

las diferentes líneas celulares observamos que en las líneas de cáncer de cérvix la metilación se produce en las islas CpG de los 5 genes en CasKi mientras que en SiHa se observa metilación en 4 promotores (en todos menos en LTBP3). FGF19, PTPRN y COL11A2 aparecen hipermetilados en las dos líneas de cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231), PARVG sólo en MCF7 y LTBP3 no aparece metilado ni en MCF7 ni en MDA-MB-231. En las siete líneas de cáncer de colon el patrón de metilación que se observa es bastante más heterogéneo. Mientras que en líneas como SW48 y RKO todos los genes analizados aparecen hipermetilados en otras como Colo205 sólo aparece hipermetilado uno de los genes (PTPRN) o ninguno como en SW480. En la línea celular LoVo todos los genes excepto PTPRN están hipermetilados, en HCT15 tres de los cinco genes están hipermetilados, FGF19, COL11A2 y PTPRN, y en HCT116 aparecen hipermetilados COL11A2, PTPRN y PARVG. En las dos líneas celulares de cáncer de pulmón analizadas (H-562 y H-522) la metilación observada es muy baja apareciendo hipermetilado sólo el promotor del gen COL11A2 en H-522. En cuanto a los linfomas, Raji presenta todos los genes hipermetilados, Karpas los tiene todos hipermetilados excepto LTBP3 y la línea celular HUT78 presenta hipermetilación de los promotores de los genes FGF19, COL11A2 y PTPRN. En leucemias la metilación es muy heterogénea, habiendo líneas en las que todos los promotores están metilados, como MOLT16 y HL60, y líneas como REH en las que sólo lo están COL11A2 y PTPRN.

Línea celular	FGF19	COL11A2	PTPRN	PARVG	LTBP3
CasKi	M	M	M	M	M
SiHa	M	M	M	M	U
MCF7	M	M	M	M	U
MDA-MB-231	M	M	M	U	U
LoVo	M	M	U	M	M
SW48	M	M	M	M	M
SW480	U	U	U	U	U
Colo205	U	U	M	U	U
RKO	M	M	M	M	M
HCT15	M	M	M	U	U
HCT116	U	M	M	M	U
Raji	M	M	M	M	M
Karpas	M	M	M	M	U
HUT78	M	M	M	U	U
MOLT4	U	M	U	M	M
MOLT16	M	M	M	M	M
Jurkat	M	M	M	U	M
REH	U	M	M	U	U
KG1a	M	U	M	U	M
HL60	M	M	M	M	M
K562	U	U	U	U	U
H522	U	M	U	U	U

Tabla 5. Análisis de metilación por secuenciación de bisulfito de las islas CpG de los genes seleccionados en líneas celulares de cáncer humano. Se utilizaron líneas representativas de cáncer de cérvix, de mama, de colon, pulmón, leucemias y linfomas. “M” indica que la isla CpG se encuentra metilada y “U” no metilada.

2.8 Las islas CpG hipermetiladas se asocian con represión transcripcional y el tratamiento con el agente desmetilante 5’aza-2-desoxicitidina da lugar a la re-expresión génica.

Los niveles de expresión de los 5 genes seleccionados (FGF19, PARVG, COL11A2, LTBP3 y PTPRN) fueron analizados por RT-PCR. En todos los casos la metilación de la isla CpG del promotor y la presencia de

proteínas MBD se asocia con represión transcripcional. Para comprobar el efecto de la metilación en la represión transcripcional de estos genes se trataron células HeLa con 5'aza-2-desoxicitidina (inhibidor de la metilación del DNA) 5 μ M durante 72 horas. De estas muestras se extrajo RNA para analizar la expresión de los genes. Como control positivo se utilizó cDNA obtenido a partir de RNA de linfocitos de un individuo sano (NL). Se observa la re-expresión de todos los genes cuya isla se encuentra hipermetilada excepto del gen PARVG tras el tratamiento desmetilante con Aza (figura 24). El hecho de que PARVG no se re-exprese tras el tratamiento con Aza podría deberse a que el tratamiento con este tipo de drogas, aunque eficiente en la mayoría de los casos, no consigue una desmetilación exhaustiva del genoma por lo que el promotor de este gen podría seguir metilado, al menos parcialmente, tras el tratamiento. Otra posibilidad es que la desmetilación del DNA por sí misma no consiga restablecer la actividad génica y sea necesario combinar el tratamiento con Aza con algún agente inhibidor de las enzimas HDAC como el TSA (Tricostatina A) para conseguir además la desacetilación de los extremos N-terminales de las histonas. Y aún así, no se puede descartar la necesidad de otros factores nucleares reguladores de la transcripción en el proceso de activación de este gen en la línea celular HeLa.

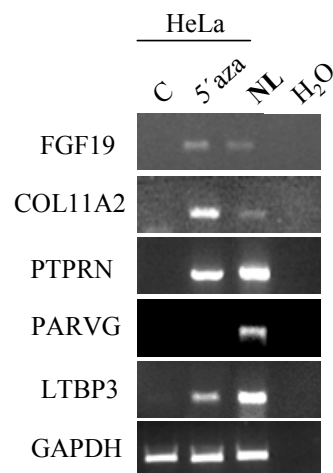


Figura 24. Datos de expresión de los genes en células HeLa tratadas y sin tratar con el agente desmetilante 5'aza-2-deoxicitidina. Como control positivo se utilizó cDNA preparado a partir de RNA de linfocitos de un individuo sano. Como control de carga se analizaron los niveles de GAPDH.

2.9 Las islas CpG de los genes seleccionados están hipermetilados en tumores primarios.

Tras observar que los genes hipermetilados en HeLa y no metilados en tejido normal están hipermetilados de forma aberrante en líneas celulares de cáncer humano de todo tipo, decidimos estudiar el estado de metilación de los promotores de estos genes en muestras de tumores primarios humanos. Para ello, un número representativo de muestras de cada tipo de tumor (cervix, mama, colon, pulmón, linfomas y leucemias) fueron modificadas con bisulfito sódico y se analizaron los estados de metilación de los promotores por MSP (figura 25). Se eligió esta técnica porque en las muestras de tumores suele haber mezcla de poblaciones tumorales y sanas por lo que el análisis por secuenciación daría lugar a resultados sesgados.

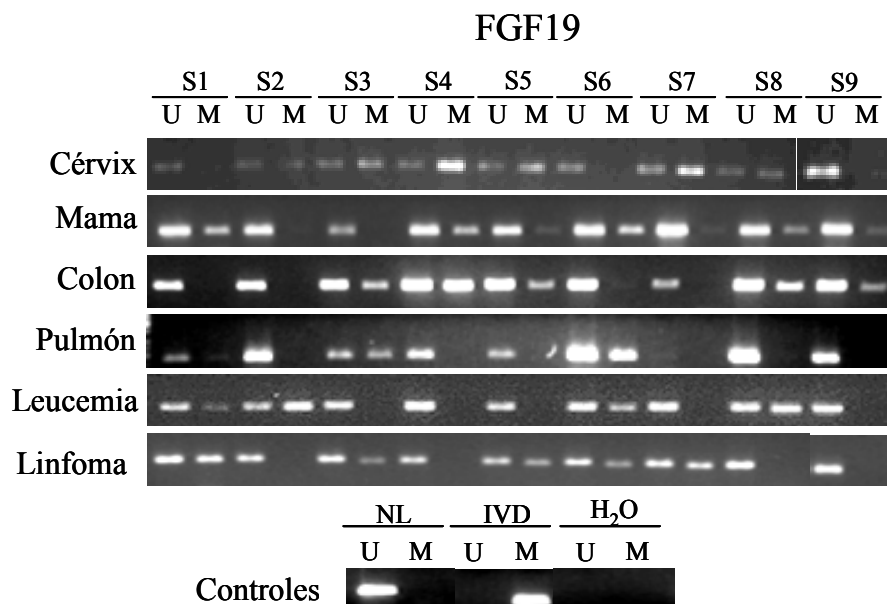


Figura 25. MSP (*Methylation Specific PCR*) del promotor del gen FGF19 en las muestras de tumores de mama y leucemias. Como control de no metilación se ha utilizado DNA modificado con bisulfito sódico de linfocitos normales (NL) y como control de metilación DNA metilado *in vitro* (IVD, *in vitro methylated DNA*). En todas las muestras la reacción de no metilación (U) se coloca delante seguida de la reacción de metilación (M).

En la tabla 6 se muestran los porcentajes de metilación encontrados para cada promotor en los diferentes tipos de tumores primarios. Como podemos observar, los porcentajes de metilación son bastante elevados en todos los casos, siendo las muestras de tumores de cérvix las que presentan en general mayor porcentaje de metilación. En el caso de los tumores primarios de colon, la metilación es aproximadamente el 50 % para los genes FGF19, COLL11A2 y PTPRN siendo bastante menor el porcentaje de metilación de PARVG y LTBP3. Estos datos correlacionan muy bien con los datos de metilación observados en líneas celulares de cáncer de colon. Las muestras de tumores pulmonares son las que muestran en general un menor porcentaje de metilación en los genes seleccionados, no encontrándose ningún caso metilado para LTBP3. Este comportamiento es nuevamente muy similar al observado en el estudio en líneas celulares de

cáncer humano de pulmón. En las muestras de tumores de mama la metilación es bastante elevada, siendo LTBP3 el gen con menor porcentaje de metilación. En las muestras de leucemia (que incluyen ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) y CML (*Cronic Lymphoblastic Leukemia*)) todos los genes aparecen metilados en un porcentaje muy elevado de las muestras analizadas, siendo de nuevo LTBP3 el gen con menor porcentaje de metilación. En el caso de las muestras de linfomas, la metilación es muy elevada en los genes FGF19, COL11A2 y PTPRN, siendo bastante más baja pero aún así significativa la metilación de los promotores de PARVG y LTBP3.

El porcentaje de metilación del promotor del gen LTBP3 es el más bajo en todos los tipos de tumores primarios estudiados excepto en las muestras de cáncer de cérvix, por lo que parece que está implicado en menor grado en el desarrollo de tumores.

Los datos de metilación en tumores primarios y los de metilación en líneas celulares siguen la misma tendencia si se comparan en función del origen tumoral por lo que parece que las líneas celulares son un buen modelo para el estudio de los procesos neoplásicos.

	Tipo de tumor					
	Cérvix	Colon	Pulmón	Mama	Leucemia*	Linfoma
FGF19	38.2%(13/34)	50%(12/24)	13%(3/23)	55%(20/36)	38%(16/42)	55%(17/31)
COL11A2	50%(14/28)	57.8%(11/19)	31%(11/35)	68%(23/34)	51%(23/45)	52.6%(10/19)
PTPRN	50%(10/20)	52.6%(10/19)	45%(18/40)	31.8%(7/22)	45%(20/44)	57.8%(11/19)
PARVG	61%(11/18)	10%(2/20)	42.3%(11/26)	47.4%(9/19)	41%(7/17)	21%(4/19)
LTBP3	53%(25/47)	13%(3/23)	0%(0/16)	13%(2/16)	37%(10/27)	24%(6/25)

*las muestras de leucemias corresponden a ALL Y CLL

Tabla 6. Porcentajes de metilación en muestras de tumores primarios en los genes seleccionados.

2.10 La reintroducción de FGF19 y PARVG inhibe la capacidad proliferativa de la línea celular HeLa.

Para determinar la importancia en los procesos tumorales de los genes hipermetilados encontrados tras la eliminación de las MBD por siRNA se estudió la capacidad supresora del desarrollo de tumores de dos de los genes, FGF19 y PARVG, mediante ensayos de formación de colonias y de proliferación celular. Para ello se clonó en el vector de expresión pCDNA3.1(+) los cDNA de FGF19 y de PARVG y se transfectaron en HeLa mediante electroporación. Como control se transfectaron células con el plásmido vacío (*mock*). Se eligieron estos dos genes por tener su menor tamaño (FGF19 661 pb y PARVG 996 pb), lo que facilita la clonación del cDNA y dan lugar a proteínas de tamaño adecuado para la expresión en células eucariotas.

Los clones positivos se seleccionaron por *Western blot* con anticuerpos específicos contra FGF19 y PARVG (figura 26A). Un clon positivo para cada gen y células electroporadas con el plásmido vacío fueron sembrados a diferentes concentraciones en placas de 96 pocillos y se midió durante 5 días el número de células vivas mediante tinción con MTT. Las células que expresan FGF19 así como las que expresan PARVG presentan una capacidad de crecimiento menor que la de las células transfectadas con el plásmido vacío (figura 26B).

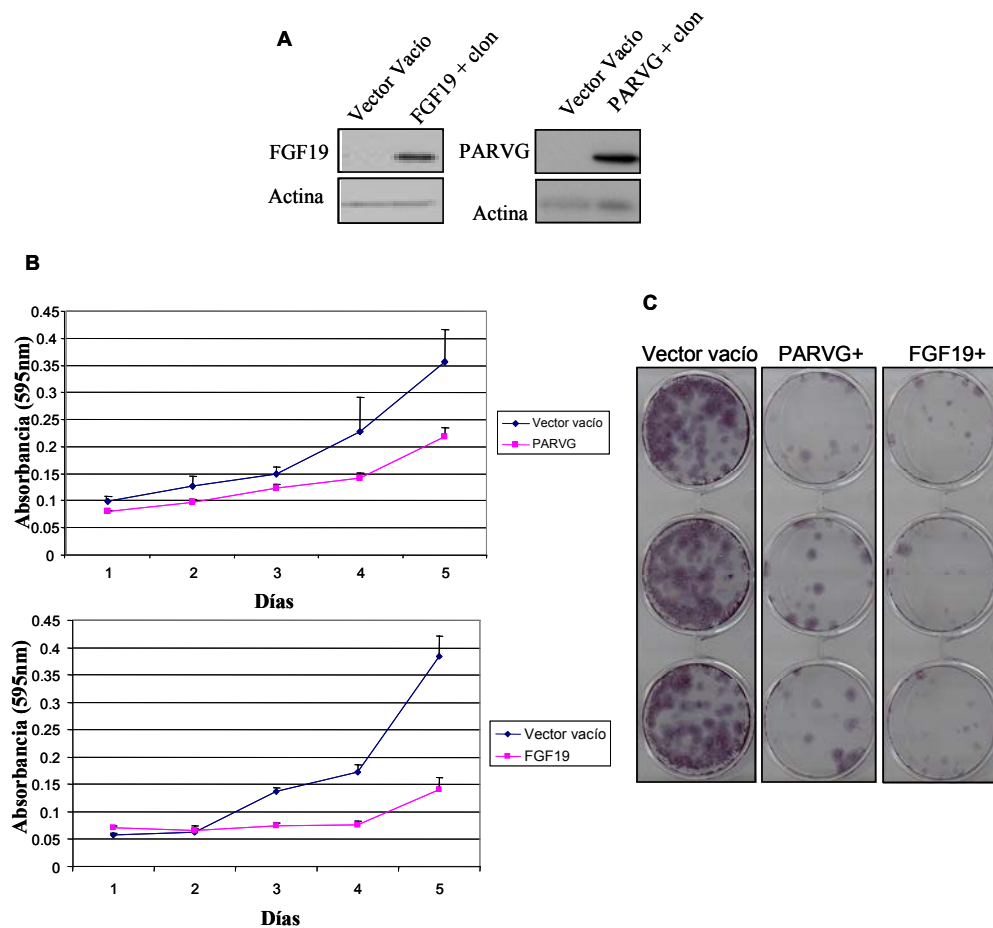


Figura 26. Reintroducción de los genes FGF19 y PARVG en células HeLa. A) *Western blot* donde se muestra la expresión de FGF19 y PARVG en los clones seleccionados para los ensayos funcionales. Como control se analizaron los niveles de β -actina. B) Ensayo de proliferación celular. Como control se analizó la proliferación de las células transfectadas con el plásmido vacío. C) Ensayo de formación de colonias. Como control se analizó la capacidad de formar colonias de las células transfectadas con el plásmido vacío.

Se midió también la capacidad de las células transfectadas para formar colonias. Para ello sembramos células transfectadas con el plásmido vacío (mock), células positivas para la expresión de FGF19 y células positivas para la expresión de PARVG a diferentes concentraciones (100, 2000, 3000 y 4000 células/100 μ l de medio) en placas de 30 mm y se dejaron crecer hasta la formación de colonias visibles. Las colonias se tiñeron con MTT y se contabilizaron por densitometría. Tanto las células

que expresan FGF19 como las que expresan PARVG tienen menor capacidad de formar colonias que las células transfectadas con el plásmido vacío (figura 26C), lo que indica que estos genes tienen actividad supresora de tumores.

2.11 Ratones atímicos.

La habilidad de las células transfectadas con FGF19 y PARVG para formar tumores en un sistema más parecido a la realidad se estudió mediante la implantación subcutánea de células en ratones atímicos. 10 ratones atímicos fueron inyectados subcutáneamente con células transfectadas con el vector vacío (*mock*) (flanco izquierdo), células transfectadas con FGF19 (flanco derecho) y con células transfectadas con PARVG (hombro izquierdo). El tamaño de los tumores fue medido diariamente. Todos los ratones fueron sacrificados 20 días después de la inyección y los tumores fueron diseccionados y medidos. Las células transfectadas con el vector vacío formaron tumores rápidamente mientras que las células que expresan PARVG o FGF19 tenían mucha menor tumorigenicidad. El día de la muerte de los ratones los tumores formados por las células *mock* eran más grandes, $1400 \pm 150\text{mm}^3$, que los inducidos por FGF19, $1050 \pm 100\text{ mm}^3$, y PARVG, $250 \pm 50\text{mm}^3$ (figura 27).

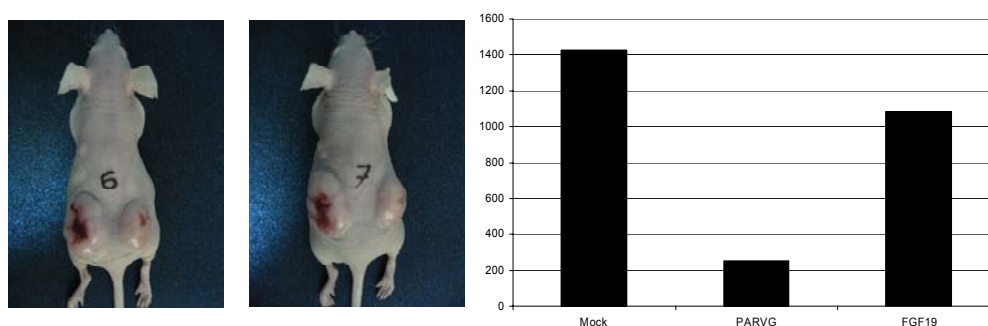


Figura 27. Estudio de la capacidad de formar tumores en ratones atímicos. Células transfectadas con FGF19, PARVG o el plásmido vacío fueron inyectadas en ratones atímicos y el tamaño del tumor inducido monitorizado diariamente.

Clonación de nuevas isoformas de MBD1 y caracterización *in vitro* de las constantes de afinidad de las isoformas MBD1 Δ 10,12,15b; MBD1 Δ 10, 15b; MBD1 Δ 10 y MBD1 Δ 15b

La proteína MBD1 tiene siete variantes de *splicing* (figura 7). Seis de estas siete variantes han sido descritas en el artículo de los autores Fujita *et al.* (2000) y la séptima se caracterizó durante la realización de esta tesis doctoral. Con el fin de determinar las diferencias existentes entre las variantes de MBD1 respecto a su capacidad de asociarse a DNA metilado y no metilado, se clonaron y expresaron en *Escherichia coli* aquellas que aparecen de forma mayoritaria en líneas celulares de cáncer humano y se analizaron las diferencias en la afinidad de las diferentes isoformas de MBD1 por DNA metilado y no metilado utilizando la tecnología SPR (*Surface Plasmon Resonance*).

3.1 Clonación de las isoformas de MBD1 en pET21b y expresión en BL21(DE3).

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el cDNA de las distintas isoformas de MBD1 y se clonaron en el vector pET21b, que añade una cola de polihistidinas en el extremo C-terminal. Como oligonucleótido directo (F, *forward*) se utilizó el mismo para todas las isoformas, siendo diferente el oligonucleótido reverso (R, *reverse*). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

MBD1-F	GGGAACTCCATATGGCTGAGGACTGGCTGGAC
MBD1v1,v3,v4-R	CCGGAATTCGGCTGCTTTCTAGCTCCAGGTTT
MBD1v2-R	CCGGAATTCGGACTCTGTGAGGAAGGGCACCA
MBD1v6-R	CCGGAATTCGGAATGTCAATCAAATAAATTTC

Para amplificar las isoformas de MBD1 se extrajo RNA de la línea celular SW-48 y se retrotranscribió a cDNA. Se escogió esta línea celular porque por *Western blot* se observa la expresión de al menos tres de las isoformas, que son las que reconoce el anticuerpo contra MBD1. El análisis de las secuencias clonadas reveló que existe una séptima isoforma a la que hemos denominado MBD1 Δ 10 por carecer del exon 10.

Se clonaron las isoformas MBD1 Δ 10,15b, MBD1 Δ 10,12,15b, MBD1 Δ 15b y MBD1 Δ 10. La isoforma MBD1 Δ 15b es la única que tiene los tres dominios CxxC, mientras que el resto tienen sólo los dominios CxxC1 y CxxC2 (figura 7).

Se transformaron bacterias competentes BL21(DE3) con el plásmido pET21b con las diferentes isoformas de MBD1 insertadas. La expresión de las isoformas de MBD1 se llevó a cabo como se describe en el apartado 16.2 de materiales y métodos. Todas las isoformas se expresan en la fracción soluble, como se comprobó por *Western blot* (figura 28A). A continuación se purificó la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad en una columna de níquel, lo que permite seleccionar las isoformas de MBD1 a través de la cola de polihistidina (figura 28B). La pureza de las proteínas tras la elución fue comprobada por tinción con azul brillante de *Coomassie* tras separación en un gel SDS-PAGE al 10 % (figura 28C).

3.2 Análisis de afinidad por SPR (*Surface Plasmon Resonance*)

Se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos con la misma secuencia pero diferentes grados de metilación que fueron sintetizados por Operon. Dos de los oligonucleótidos se diseñaron sin dinucleótidos CpG metilados, otro con un dinucleótido CpG metilado y por último uno con 12 dinucleótidos CpG metilados. Los oligonucleótidos fueron biotinilados en el extremo 3' para unirlos a la matriz de dextrano sobre la que se llevan a cabo las interacciones. Para la biotinilación utilizamos dUTP-Biotina como sustrato de la enzima TdT, una transferasa terminal recombinante.

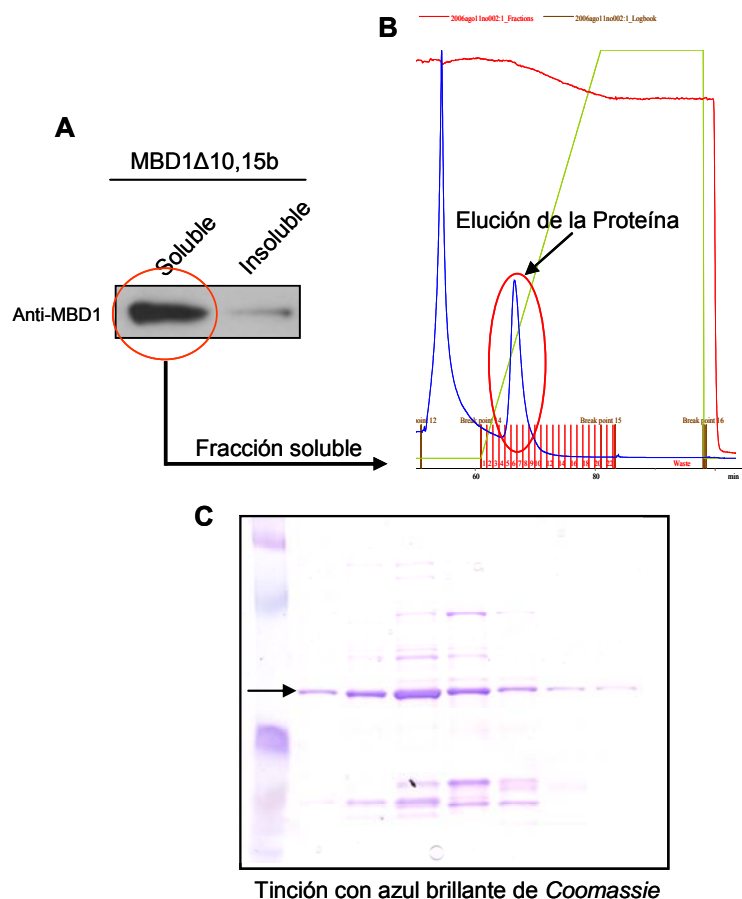


Figura 28. Expresión y purificación de las isoformas de MBD1. A) *Western blot* donde se muestra que la expresión de las isoformas clonadas tiene lugar en la fracción soluble del cultivo. B) Purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. C) Tinción con azul brillante de *Coomassie* de las fracciones obtenidas tras la purificación. Se indica con una flecha la banda correspondiente a MBD1.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

GAM1-F	GATCCGACGACGACGACGACGAmCGACGACGACGACGACGATC
GAM1-R	GATCGTCGTCGTCGTCGTCGTmCGTCGTCGTCGTCGTCGGATC
GAC-F	GATCCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGATC
GAC-R	GATCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGGATC
GAM12-F	GATCmCGAmCGAmCGAmCGAmCGAmCGAmCGAmCGAmCGAmCGAmCGATC
GAM12-R	GATmCGTmCGTmCGTmCGTmCGTmCGTmCGTmCGTmCGTmCGTmCGGATC

A continuación, los oligonucleótidos biotinilados se unieron a matrices de dextrano CM5 (BIAcore) previamente fijadas con estreptavidina.

Las constantes de afinidad (KD) de las diferentes isoformas de MBD1 por los oligonucleótidos diseñados se calcula dividiendo la constante de disociación (Kd) entre la de asociación (Ka). Ambas constantes se determinan a partir del sensorgrama de unión de las diferentes isoformas de MBD1 a las matrices con los oligonucleótidos fijados (figura 29).

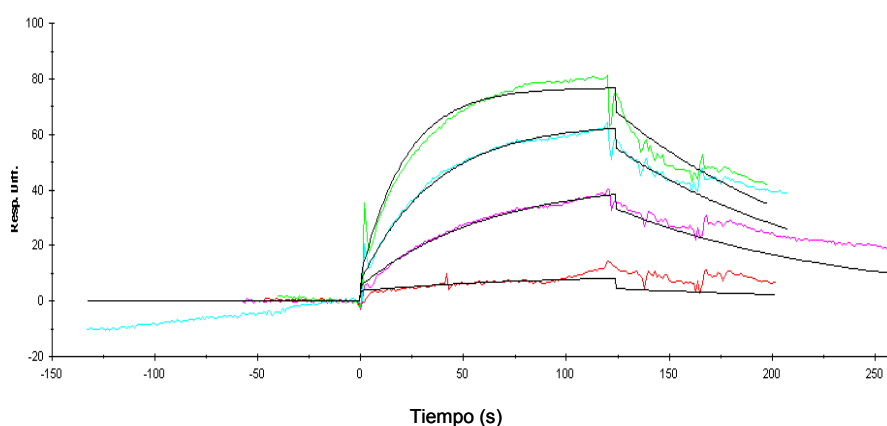


Figura 29. Esquema de un sensorgrama típico. Se observa una fase de asociación y una de disociación, la relación entre la pendiente de la curva de disociación (Kd) y la de asociación (Ka) corresponde a la constante de afinidad (KD).

	MBD1Δ10,12,15b	MBD1Δ10	MBD1Δ15b	MBD1Δ10,15b	Control negativo
GAC	3.88E-07M	1.51E-06M	2.89E-08M	3.33E-07M	-
GAM1	4.83E-07M	4.95E-07M	6.59E-08M	2.90E-07M	-
GAM12	4.08E-08M	4.04E-08M	1.55E-08M	1.40E-08M	-

Tabla 7. Constantes de afinidad (KD) de las isoformas MBD1Δ10; MBD1Δ10,15b; MBD1Δ15b y MBD1Δ10,12,15b. Como control negativo se analizaron las constantes de afinidad de una proteína no relacionada (ScFv-MBP7).

En la tabla 7 se muestran las constantes de afinidad obtenidas para cada isoforma con los distintos oligonucleótidos. Como control negativo se

analizó la afinidad de una proteína no relacionada (ScFv-MBP7), para la que no se observa unión a ninguno de los oligonucleótidos.

La afinidad de todas las isoformas por el oligonucleótido con 12 grupos metilo está en el orden de magnitud 10^{-8} mM, mientras que la afinidad por DNA no metilado es menor (MBD1 Δ 10,12,15b: 10^{-7} mM; MBD1 Δ 10,15b: 10^{-7} mM; MBD1 Δ 10: 10^{-6} mM) en todos los casos excepto para la isoforma MBD1 Δ 15b, que muestra una afinidad por el oligonucleótido no metilado del mismo orden de magnitud que por el oligonucleótido con 12 grupos metilo (10^{-8} mM). La afinidad de la isoforma MBD1 Δ 15b, que es la única isoforma que contiene el dominio CxxC3 de las cuatro isoformas clonadas en este estudio, por el oligonucleótido no metilado es 1 o 2 órdenes de magnitud mayor que la afinidad del resto de isoformas analizadas (10^{-8} mM frente a 10^{-7} mM y 10^{-6} mM). El dominio CxxC3 es el responsable de la unión de MBD1 a DNA no metilado (Jørgensen *et al.*, 2006), por tanto es lógico pensar que la mayor afinidad de la isoforma MBD1 Δ 15b por DNA no metilado en comparación con las afinidades de las otras isoformas por la misma secuencia no metilada sea debida precisamente a este dominio. Sin embargo, la afinidad de las isoformas sin el dominio CxxC3 por DNA no metilado, aunque menor, es también muy alta por lo que también podrían estar implicadas en el silenciamiento transcripcional de secuencias no metiladas. No obstante, hay que tener en cuenta que esta afirmación está basada en datos de afinidad obtenidos en ensayos *in vitro*. *In vivo*, la formación de complejos, la interacción con otros factores o la disponibilidad de cada isoforma podría determinar el reclutamiento de cada una de ellas a diferentes regiones del genoma.

Aparte del dominio CxxC3, las isoformas clonadas difieren en la presencia o ausencia del exon 15b y en el dominio TRD. Así, MBD1 Δ 10 es la única isoforma clonada que contiene el exon 15b. Esta isoforma es la que muestra menor afinidad por el oligonucleótido no metilado por lo que este

exon podría estar inhibiendo la unión al DNA *in vitro*, jugando algún papel regulador de la función de MBD1 Δ 10 desconocido hasta el momento. El TRD no parece afectar a la afinidad de las diferentes isoformas por el DNA ya que la única variante que carece de parte de este dominio es MBD1 Δ 10,12,15b y sus constantes de afinidad no difieren de las constantes de las variantes con el TRD completo.

Discusión

Esta tesis doctoral se ha centrado en investigar el papel de las proteínas MBD en procesos tumorales. En concreto, se ha investigado su implicación funcional en el silenciamiento epigenético de genes supresores tumorales que sufren hipermetilación de sus promotores en cáncer. El presente estudio ha contribuido no sólo a profundizar en este aspecto sino también a entender mejor las propiedades y mecanismo de acción de esta familia de proteínas. A continuación se discuten las conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación:

Las líneas celulares de cáncer humano muestran patrones de expresión de proteínas MBD específicos, pero estos patrones de expresión no se ven reflejados en la ocupación de promotores hipermetilados por parte de las MBD.

Aunque parece que todas las proteínas MBD se expresan en mayor o menor medida en todas las líneas celulares de cáncer humano estudiadas, se observa una gran variedad en los patrones de expresión de las diferentes MBD entre las líneas celulares analizadas. Sólo MBD3 parece no sufrir grandes cambios de expresión cuando se comparan las diferentes líneas celulares.

El dominio MBD de MBD3 no tiene capacidad de unión a DNA metilado debido a mutaciones puntuales en residuos altamente conservados en el resto de proteínas MBD. Sin embargo, la importancia de esta MBD no sólo se pone de manifiesto en el fenotipo de los ratones *knock out*, en los que la eliminación de MBD3 hace que no sean viables muriendo durante el desarrollo embrionario (Hendrich *et al.*, 2001), sino que también se puede observar en los cambios que provoca en las modificaciones de histonas su eliminación. MBD3 forma parte del complejo con actividad modificadora de histonas y remodeladora de cromatina Mi-2/NuRD, por lo que los niveles similares en todas las líneas celulares podría deberse a que esta proteína no está reconociendo directamente el DNA metilado sino formando parte de

dicho complejo. Por lo tanto, el resto de proteínas MBD podrían tener papeles redundantes en la célula, sin embargo, el papel de MBD3 en el complejo Mi-2/NuRD podría ser esencial y no parece que pueda ser reemplazada por otras MBD.

El perfil de unión de proteínas MBD a los promotores hipermetilados en cada línea celular podría reflejar los niveles de expresión de cada MBD y sus diferentes isoformas. Sin embargo, la mayor disponibilidad de una determinada MBD en cada línea celular no se corresponde con una mayor ocupación por parte de esa MBD de promotores hipermetilados por lo que parece que la unión de una MBD u otra depende, pese a la redundancia al menos parcial de muchas de ellas, de su papel específico en la célula. Es también posible que la presencia de las distintas MBD en los promotores dependa de la disponibilidad de otros factores nucleares que las reclutan a cada promotor en cada línea celular de manera independiente de los niveles totales de expresión de cada MBD y sus diferentes isoformas. Así, por ejemplo, en las tres líneas de cáncer de colon incluídas en el estudio (LoVo, SW48 y HCT15) la isoforma de tamaño intermedio de MBD1 es la proteína MBD más abundante y sólo en estas tres líneas es esta isoforma la MBD mayoritaria. Esto podría indicar que la expresión de dicha isoforma de MBD1 es una característica de la transformación tumoral en cáncer de colon.

Las proteínas MBD se unen de forma preferente a promotores hipermetilados y cuando se observa una MBD unida a promotores no metilados suele ser MBD1.

El patrón de unión de proteínas MBD a los 22 genes supresores de tumores y de reparación del DNA en las 10 líneas celulares de cáncer humano utilizadas en este estudio pone de manifiesto la afinidad de estas proteínas por DNA metilado ya que el 89% de los promotores metilados aparece ocupado por proteínas MBD. Una posible explicación para el 11%

de promotores metilados no aparecen ocupados por ninguna MBD es la existencia de otras proteínas de unión a DNA metilado como los miembros de la familia Kaiso (Kaiso, ZBPB4 y ZBPB38) (Prokhortchouk *et al.*, 2001; Fillion *et al.*, 2006), nuevas proteínas de la familia MBD (Roloff *et al.*, 2003) o la propia MBD4, que no ha sido incluida en este estudio por estar relacionada principalmente con el mecanismo de reparación del DNA debido aunque también se ha visto que está implicada en la transcripción génica dependiente de metilación (Kondo *et al.*, 2005).

No obstante, se ha observado la presencia de proteínas MBD en el 28% de los promotores no metilados. En estos casos cabe destacar que MBD1 es la proteína que aparece unida en 23 de los 26 casos estudiados. Esto puede ser debido a que MBD1 contiene dominios CxxC de unión a DNA independientes del dominio de unión a DNA metilado MBD. En la unión de MBD1 a secuencias no metiladas parece jugar un papel fundamental el tercer dominio CxxC (Fujita *et al.*, 2000). Este hecho ha sido corroborado en este mismo trabajo mediante el estudio *in vitro* de la afinidad de diferentes isoformas de MBD1 a DNA metilado y no metilado. Los datos obtenidos indican que en general las isoformas de MBD1 estudiadas tienen una elevada afinidad por DNA no metilado (aunque menor que por secuencias de DNA metilado). Además, la isoforma MBD1Δ15b que contiene el dominio CxxC3 tiene una afinidad similar por las secuencias metiladas y las no metiladas y mayor afinidad por las secuencias de DNA no metilado que el resto de isoformas que no lo contienen. No obstante, debido a que no hay anticuerpos que puedan discernir entre las diferentes isoformas de MBD1 no se puede determinar qué isoforma de MBD1 es la que aparece unida a los promotores no metilados en cada caso, pero cabe esperar que sea alguna de las isoformas que contienen el dominio CxxC3.

La especificidad de promotor por parte de las MBD en diferentes líneas celulares con orígenes tumorales variados se observa sobretodo para MeCP2 y para MBD2 (test no paramétrico de Kruskal-Wallis, $p=0.011$), sin

embargo, para MBD1 y MBD3 no encontramos especificidad alguna. Por ejemplo, el promotor de CDH13 aparece ocupado por MeCP2 en 8 de los 9 casos en los que este está hipermetilado, sin embargo, un resultado tan claro como este no lo hemos visto para ningún otro promotor por lo que parece más bien que las MBD se unen de forma inespecífica a las nuevas secuencias metiladas en diferentes líneas celulares. De los datos obtenidos también se deduce que aquellos genes que aparecen metilados en un mayor porcentaje de líneas celulares exhiben más especificidad en el reclutamiento de proteínas MBD que aquellos que aparecen metilados con menor frecuencia.

El caso de CDH13, en el que la ocupación por parte de MeCP2 es tan clara, es de especial interés porque ha sido publicado que MeCP2 requiere la presencia de secuencias ricas en los nucleótidos adenina y timina en la región metilada para su unión (Klose *et al.*, 2005), condición que se da para el promotor de este gen. Sin embargo, en nuestro estudio MeCP2 aparece unida a otros promotores en los que esta condición no se da, así como en promotores en los que se da la condición pero aparecen unidas también otras proteínas MBD. Por tanto, la presencia de estas secuencias ricas en A/T no parece una condición esencial para la unión de MeCP2 a promotores metilados, ya que también se encuentra unida a regiones sin ella. Aun así no se puede descartar que la presencia de estas secuencias pueda favorecer la unión en cierto modo.

La unión de proteínas MBD a promotores de genes supresores de tumores hipermetilados en cáncer está asociada con la represión transcripcional.

La unión de proteínas MBD a promotores hipermetilados en cáncer tiene como consecuencia el reclutamiento de complejos correpresores que impiden la transcripción génica mediante la modificación de los extremos N-terminales de las histonas. Nuestros datos muestran una clara asociación

entre hipermetilación de promotores, unión de proteínas MBD y represión transcripcional.

La unión de una determinada MBD no parece afectar al grado de silenciamiento transcripcional ya que todas ellas reprimen totalmente la transcripción génica en paralelo o de manera coordinada con la metilación del DNA. No obstante, hay algunos casos en que la presencia de una MBD no necesariamente implica represión transcripcional. Estos casos se corresponden siempre a promotores no metilados en los que se ha detectado el reclutamiento de alguna de las isoformas de MBD1. La presencia de isoformas de MBD1 en promotores no metilados ha quedado ya explicada por la presencia en ellas de dominios de unión a DNA no metilado y la afinidad que estas muestran tanto por DNA metilado como no metilado, sobretodo las isoformas con el tercer dominio CxxC. No obstante, los mecanismos de represión de esta MBD1 no están claros y aunque puede jugar un papel importante en la regulación transcripcional su sola presencia no sería suficiente para la represión por lo que se requerirían otros factores transcripcionales.

La eliminación de las proteínas MBD por siRNA da lugar a un patrón de modificaciones de las histonas asociado con la activación transcripcional.

La eliminación de las proteínas MBD mediante la técnica de RNA de interferencia da lugar a un cambio en la estructura de la cromatina definido por la aparición de modificaciones postraduccionales en las histonas asociadas a estados activos de la cromatina. Estos cambios se caracterizan por un aumento en los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4, así como por el descenso de los niveles de trimetilación de la lisina 9 y el ascenso de la trimetilación de la lisina 4 de H3.

En el análisis de las histonas por cromatografía capilar de alta resolución (HPCE) se observa que MeCP2 es la MBD que da lugar a un

aumento mayor de los niveles globales de acetilación de H4, siendo incluso el aumento mayor que el producido por la eliminación de la enzima con actividad histona desacetilasa HDAC2. HDAC2 forma parte de complejos correpresores como Sin3A, que es reclutado por MeCP2 a los sitios metilados y del que también forma parte HDAC1. La eliminación de MeCP2 impediría la unión de cualquier forma del complejo Sin3A a la cromatina mientras que la eliminación de HDAC2 podría dar lugar a la formación de complejos formados sólo con subunidades de HDAC1 activos aunque funcionalmente menos eficientes.

El análisis por *Western blot* muestra un ligero aumento de los niveles de acetilación global de la histona H4 cuando se elimina MeCP2 o MBD1 mientras que la eliminación de MBD2 o MBD3 afecta sobretudo a los niveles de acetilación global de la histona H3. Esto puede ser debido a que cada proteína MBD está asociada con diferentes complejos modificadores de las histonas y por lo tanto su eliminación dan lugar a distintos patrones de modificaciones de las histonas. También puede ser que cada MBD se asocie a regiones concretas del genoma dando lugar a patrones de modificaciones de las histonas distintos. Por otra parte, hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado en resultados, las limitaciones de los anticuerpos empleados que pueden dar lugar a malas interpretaciones de lo que está sucediendo con los niveles de acetilación global tanto de la histona H3 como de la histona H4 cuando eliminamos las proteínas MBD.

Aunque se observan cambios en las modificaciones de las histonas al eliminar cualquiera de las MBD, el análisis de modificaciones específicas de cada residuo de las histonas por *Western blot* muestra que es la eliminación de MBD3 la que produce cambios más significativos hacia una estructura de la cromatina relacionada con la actividad transcripcional. Esta transición se caracteriza por un aumento de la acetilación de H3 y H4, un aumento de la trimetilación de la lisina 4 de H3 y un descenso de la trimetilación de la lisina 9 de H3. MBD3 tiene un dominio MBD no funcional en mamíferos

pero como ya hemos dicho anteriormente, forma parte de un complejo con actividad modificadora de histonas y remodeladora de cromatina llamado Mi-2/NuRD. Por tanto, su eliminación mediante siRNA podría estar impidiendo la formación de este complejo proteico, lo que explicaría los efectos observados al analizar por *Western blot* el estado de acetilación de las histonas. El complejo Mi-2/NuRD contiene las enzimas con actividad histona desacetilasa HDAC1 y HDAC2, y aunque no contiene directamente ninguna enzima con actividad histona metilasa o demetilasa que pueda explicar los cambios de metilación de la histona H3 observados, no es descabellado pensar en una secuencia de modificaciones de la cromatina como consecuencia de la eliminación de las MBD en la que a la incapacidad de reclutar el complejo represor con actividad histona desacetilasa con las consecuencias sobre la acetilación descritas le siga el reclutamiento de actividades histona metilasa y demetilasa entre otras.

En cuanto a las proteínas MBD con dominio de unión a DNA metilado funcional, la eliminación de MBD2 es la que provoca cambios más drásticos en las modificaciones específicas de las histonas siendo estos similares a los cambios observados para MBD3, especialmente en la trimetilación de la lisina 4 y la lisina 9 de la histona H3. Se ha descrito la interacción de MBD2 con el complejo correpresor Mi-2/NuRD, del que forma parte MBD3, dando lugar al complejo MeCP1 (Ng *et al.*, 1999), por lo que la paridad en los cambios producidos por la eliminación de MBD2 y MBD3 podría deberse a que están implicadas en el mismo mecanismo de modificación de histonas y silenciamiento génico.

No obstante, es sorprendente el poco o nulo efecto que la eliminación de MeCP2 tiene sobre algunas de las modificaciones de las histonas. De todas formas, debido a la complejidad de la regulación epigenética y la multitud de elementos que forman parte de ella es difícil explicar muchos de los efectos de la eliminación de las proteínas MBD sobre la estructura de la cromatina. Las modificaciones de la cromatina constituyen un sistema muy

complejo cuya estabilidad depende de un gran número de enzimas que interaccionan entre sí dando lugar a multitud de efectos fisiológicos. La eliminación de una de las piezas de esta maquinaria de regulación tan precisa como las proteínas MBD desencadena una serie de acontecimientos que si bien tienen cierta lógica y se ciñen bastante a menudo a lo esperado, son en cierta manera impredecibles y difíciles de interpretar.

La eliminación de las proteínas MeCP2, MBD1 y MBD2 provoca la sobre-expresión de genes hipermetilados en la línea celular HeLa.

El análisis de los datos de expresión obtenidos a partir de un *microarray* de cDNA tras la eliminación de MeCP2, MBD1 y MBD2 en la línea celular HeLa muestra que estas tres proteínas tienen una implicación directa en la represión transcripcional de genes hipermetilados en cáncer ya que su eliminación da lugar a la sobre-expresión de una gran cantidad de genes. De estos genes, una fracción significativa (25%) presentan hipermetilación del promotor.

Del estudio de expresión y de los patrones de metilación de las islas CpG de 39 genes cuya expresión aumentó más de 2 veces al eliminar las tres MBD simultáneamente se pueden establecer tres grupos de genes: aquellos cuyo promotor no aparece metilado ni en HeLa ni en linfocitos normales (que es la muestra que utilizamos como tejido no tumoral de referencia), aquellos que están metilados tanto en HeLa como en linfocitos normales y los que sólo están metilados en HeLa.

De los tres grupos de genes el de mayor interés desde el punto de vista del estudio del cáncer es el de los genes sobre-expresados cuyas islas CpG se encuentran hipermetiladas en HeLa pero no metiladas en tejidos normales. ya que se podría considerar esta metilación como aberrante y por tanto estar implicada directamente en procesos tumorales. Se habla de “hipermetilación aberrante”, haciendo referencia a la patogenicidad de dicha metilación en muestras cancerosas ya que se piensa que no es parte del

proceso normal de regulación de la expresión sino que es un evento que puede estar en la raíz del desarrollo tumoral por dar lugar al silenciamiento de posibles genes supresores de tumores. Mediante la técnica de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) usando anticuerpos que reconocen las MBD, se ha comprobado la presencia de las MBD unidas a estas secuencias hipermetiladas, por lo que la eliminación de las MBD por siRNA parece responsable de la sobre-expresión de estos genes.

Los genes que también se encuentran hipermetilados en tejidos no transformados que se sobre-expresan al eliminar las MBD podrían estar regulados por metilación del DNA y reclutamiento de las MBD en condiciones normales en oposición a la metilación aberrante de los genes que sólo se encuentran metilados en tejidos tumorales. Clásicamente se creía que las islas CpG de los promotores de los genes no se metilan en condiciones normales, siendo la hipermetilación de las islas CpG un evento asociado al cáncer. Sin embargo, cada vez está más aceptada la existencia de una “metilación específica de tejido”, término que hace referencia a la metilación de las islas CpG como mecanismo de silenciamiento génico no asociado a ninguna patología. Nuestros datos apoyan esta teoría ya que 5 de los genes analizados están metilados también en tejidos no transformados. Analizando la ocupación de proteínas MBD en los promotores de estos genes mediante ChIP, se observa que la ocupación de estos promotores es muy similar a la observada para los promotores que no aparecen metilados de manera constante y que tienen una especificidad de ocupación por parte de las MBD baja en oposición a los genes que aparecen metilados de manera habitual en las líneas celulares (CDH13). En estos promotores se observa la presencia de varias de las MBD llegando incluso a detectarse las 4 simultáneamente. No obstante, por limitaciones técnicas del ChIP no se puede distinguir si las cuatro proteínas MBD se unen de manera simultánea al promotor en cada célula o si la MBD presente en estos promotores es diferente en cada célula siendo la unión aleatoria.

Dado que en los promotores del tercer grupo de genes donde no se observa metilación en ningún caso no hemos visto unión de ninguna MBD incluyendo MBD1 (la única capaz de reprimir la transcripción independientemente de la metilación del DNA) puede que se trate de dianas reguladas de manera indirecta por las MBD, es decir, genes que estén siendo sobre-expresados por la acción de otros genes que posiblemente sí han sido reactivados por la eliminación del control negativo que las MBD ejercen sobre su expresión.

Los mayores cambios en los niveles de expresión se observan con la eliminación de MBD2. Estos datos son coherentes con los cambios globales en las modificaciones de las histonas observados tras la eliminación de las proteínas MBD, ya que la eliminación de MBD2 (junto a la eliminación de MBD3) es la que provoca una transición mas pronunciada hacia un estado de la cromatina habitualmente asociado con la activación transcripcional. La eliminación de MBD2 en células HeLa provoca un aumento de la trimetilación de la lisina 4 junto al descenso de la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3, así como un aumento global de la acetilación. Dos estudios previos ya apuntan a la importancia de MBD2 en la regulación transcripcional y la mediación de la señal de metilación del DNA. Por un lado, estudios *in vitro* muestran que MBD2 es la MBD con mayor afinidad por DNA metilado (Fraga *et al.*, 2003). Por otro lado, experimentos de *ChIP-on-chip* con las proteínas MBD en un modelo de cáncer de mama que han mostrado que MBD2 es la MBD que se une a un mayor número de islas CpG (Ballestar *et al.*, 2003).

Existe una proporción muy baja de genes (inferior al 0,15%) cuya expresión disminuyó al eliminar las MBD MeCP2, MBD1 y MBD2 de forma individual o combinada. Como en el caso de genes sobre-expresados que no presentan metilación en la región promotora, también podría tratarse de una regulación indirecta de las MBD.

El estado de metilación del DNA no se ve alterado en los promotores de los genes sobre-expresados tras la eliminación de las proteínas MBD.

La eliminación de las proteínas MBD da lugar a la sobre-expresión de genes en la línea celular HeLa y esta sobre-expresión se produce sin cambios en el estado de metilación de los promotores de los genes. Estos datos indican que las proteínas MBD reconocen la señal de metilación y llevan a cabo su acción represora a través del reclutamiento de complejos correpresores que llevan a cabo modificaciones sobre las histonas, pero no determinan el estado de metilación del DNA. Por tanto, la metilación del DNA la llevan a cabo las proteínas DNMT y parece ser, según los datos presentados, que se trata de un evento que precede al reclutamiento de la maquinaria represora remodelante de la cromatina incluídas las MBD.

En nuestro modelo, la sobre-expresión de los genes hipermetilados de forma aberrante en HeLa tras la depleción de las proteínas MBD por siRNA se debería a la eliminación de los factores encargados de interpretar la señal de metilación del DNA y reclutar complejos correpresores a los sitios metilados, por lo que la metilación por sí sola no sería un factor suficiente para la represión de la expresión de los genes estudiados.

El tratamiento con 5-aza-2-desoxicitidina provoca la desmetilación de los promotores de los genes repimidos por la unión de proteínas MBD y los reactiva.

Los 5 genes cuyas islas CpG se encuentran hipermetiladas de forma aberrante en cáncer que se sobre-expresan tras la eliminación simultánea de MeCP2, MBD1 y MBD2 (FGF19, PARVG, COL11A2, LTBP3 y PTPRN) presentan unidas proteínas MBD. Como cabía esperar, el análisis de expresión por RT-PCR de estos genes en la línea celular HeLa muestra que no se expresan mientras que sí lo hacen en linfocitos normales en los que no

están metilados. Estos datos refuerzan la idea del carácter represor de la metilación del DNA y las MBD. Para verificar la importancia de la metilación y el papel de las MBD en el silenciamiento de estos genes, se trató la línea celular HeLa con el agente desmetilante 5-aza-2-desoxicitidina (Aza, un análogo de la 5m-Citosina que se une de forma irreversible a la subunidad catalítica de las DNMT). Este tratamiento dio lugar a la desmetilación de las islas CpG de los promotores de estos genes y a su re-expresión, lo que corrobora que el silenciamiento génico en estos casos está mediado por la metilación del DNA y la unión de proteínas MBD.

Las drogas capaces de contrarrestar los efectos provocados por una regulación anómala de proteínas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular suponen un gran avance no sólo para comprender los mecanismos implicados en ciertas patologías como el cáncer, sino también para el tratamiento de dichas enfermedades. En la actualidad hay dos agentes inhibidores de la metilación del DNA que se encuentran en fase de ensayos. Además del uso de 5-aza-2-desoxicitidina (Aza), también se está usando 2-desoxiazacitidina en ensayos clínicos para el tratamiento de algunas formas de leucemia aguda mieloide (AML) y *non-small cell lung cancer*, pero la toxicidad de estas drogas está mostrando ser un problema. El uso terapéutico de los agentes desmetilantes del DNA se hace en muchos casos en combinación con otro tipo de drogas que actúan sobre la maquinaria epigenética, los inhibidores de las HDAC. Inhibidores de HDAC como SAHA y el ácido valproico (VPA), que actúan sobre los niveles globales de acetilación provocando una descondensación inespecífica de la cromatina, se han mostrado también efectivos en el tratamiento de algunos procesos tumorales y al igual que Aza se encuentran en fase de ensayos clínicos.

Los genes sobre-expresados cuyos promotores están hipermetilados de forma aberrante en la línea celular HeLa también están hipermetilados en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano y en tumores primarios.

Los cinco genes seleccionados por su posible relevancia en cáncer se encuentran hipermetilados en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano (mama, colon, pulmón, linfomas, leucemias y cérvix) mientras que los tejidos equivalentes no transformados no muestran metilación en estas secuencias. En algunas líneas celulares aparecen los promotores de los cinco genes hipermetilados, como en CasKi, SW48, RKO, Raji, MOLT16 y HL60, aunque en otras ninguno de estos genes aparece hipermetilado, como SW480 y K522.

El estudio del estado de metilación de estas islas CpG en tumores primarios pone de manifiesto que la hipermetilación de estas secuencias es un evento común en todo tipo de cáncer humano. El hecho de que los promotores de estos genes se encuentren también hipermetilados en tumores primarios indica que pueden estar implicados en el desarrollo de procesos tumorales y que no se trata de un artefacto que se produce en las líneas celulares como consecuencia del crecimiento *in vitro*. La metilación de estos genes no sería por tanto aleatoria sino que podría estar en la raíz del propio desarrollo tumoral, llegando incluso a observarse patrones de metilación de genes característicos para los diferentes tipos de cáncer estudiados. A la vista de los datos se puede decir que los tumores primarios de pulmón son los que menos hipermetilación muestran en estas islas CpG, lo que también se puede observar en las líneas celulares con el mismo origen. Por tanto, parece que la aproximación a través del estudio previo en líneas celulares es eficaz a la hora de analizar el estado de metilación de islas CpG de genes implicados en cáncer y de buscar nuevas dianas con fines terapéuticos.

La reintroducción en la línea HeLa de los genes sobre-expresados tras la eliminación de las proteínas MBD reduce su capacidad tumorigénica por lo que podrían tener un papel de genes supresores de tumores.

Los promotores de los genes FGF19 y PARVG, seleccionados a partir de la lista de genes sobre-expresados tras la eliminación de las MBD, se encuentran hipermetilados y regulados por la unión de proteínas MBD tanto en líneas celulares de cáncer humano como en tumores primarios. La reintroducción de estos genes en la línea HeLa da lugar a una disminución en la capacidad proliferativa y de formación de colonias de dicha línea celular. Las células que expresan FGF19, así como las que expresan PARVG, se dividen menos y tienen menor capacidad de formar colonias que las células control transfectadas con el plásmido vacío. Además, las células HeLa que expresan FGF19 o PARVG generan tumores de menor tamaño que las células control cuando se inyectan subcutáneamente en ratones atímicos.

Estos datos indican que la hipermetilación y silenciamiento de estos genes influye en la capacidad tumorigénica de la línea celular HeLa y por tanto pueden ser considerados genes supresores de tumores. El hecho de que estos genes presenten su isla CpG hipermetilada en líneas celulares de cáncer humano de diferentes tipos y en tumores primarios mientras que en tejidos primarios no están metilados y se expresan. Esto nos indica que la actividad de estos genes como supresores de tumores no se ciñe exclusivamente a la línea celular HeLa ni a los tumores de cérvix, sino que pueden tener un papel fundamental en el proceso general de formación de tumores.

Existen al menos 7 isoformas de MBD1 que difieren en el número de dominios CxxC y en el extremo C-terminal de la proteína.

MBD1 es la proteína MBD con mayor número de isoformas generadas por *splicing* alternativo de un único gen. Además, esta MBD se caracteriza por la capacidad de unirse a DNA y regular la expresión génica de forma independiente a la metilación del DNA. Previamente habían sido descritas 6 isoformas de MBD1. En esta tesis doctoral se describe una nueva isoforma, MBD1 Δ 10, que carece del tercer dominio CxxC, por lo que el número de isoformas de MBD1 es al menos 7 y no 6.

Todas las isoformas de MBD1 descritas hasta el momento comparten el dominio MBD y el primero de los tres posibles dominios CxxC (dedos de zinc). Las diferencias residen en la presencia o ausencia del segundo y tercer dominio CxxC y en la longitud del exon 15b. En la unión a DNA no metilado y represión independiente de metilación llevada a cabo por MBD1 parece jugar un papel fundamental en dominio CxxC3 (Fujita *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2004).

Las isoformas de MBD1 presentan una mayor afinidad por DNA metilado *in vitro*, aunque tienen una constante de afinidad alta por DNA no metilado que aumenta en las isoformas que contienen el dominio CxxC3

La clonación de cuatro de las siete variantes de *splicing* de MBD1 y el análisis de afinidad por secuencias metiladas y no metiladas mediante SPR pone de manifiesto la importancia del tercer dominio CxxC en la unión de MBD1 a DNA no metilado. La isoforma que contiene el dominio CxxC3 es la que muestra mayor afinidad, siendo la constante de afinidad por el DNA no metilado del mismo orden que la constante de afinidad por el DNA metilado. Sin embargo, aquellas variantes que carecen del dominio CxxC3 muestran también una elevada afinidad por DNA no metilado *in vitro*, pero sin llegar a la afinidad que estas mismas isoformas muestran por el DNA

metilado. Por tanto el dominio, CxxC3 parece conferir a las isoformas de MBD1 que lo contienen una mayor afinidad por DNA no metilado, aunque esta afinidad no depende exclusivamente de él.

La afinidad de las isoformas de MBD1 sin el dominio CxxC3 por DNA aumenta al introducir grupos metilo en el oligonucleótido utilizado. Sin embargo, la afinidad de la isoforma de MBD1 que contiene el dominio CxxC3 se mantiene en el mismo orden de magnitud independientemente de los grupos metilo que contengan los oligonucleótidos.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se puede concluir lo siguiente:

- 1) Las líneas celulares de cáncer humano muestran patrones de expresión de proteínas MBD específicos, pero estos patrones de expresión no se ven reflejados en la ocupación de promotores hipermetilados por parte de las MBD.
- 2) Las proteínas MBD se unen de forma preferente a promotores hipermetilados y cuando se observa una MBD unida a promotores no metilados suele ser MBD1.
- 3) La unión de proteínas MBD a promotores de genes supresores de tumores hipermetilados en cáncer se asocia a represión transcripcional.
- 4) La eliminación de las proteínas MBD por siRNA da lugar a un patrón de modificaciones de las histonas asociado a actividad transcripcional.
- 5) La eliminación de las proteínas MBD provoca la sobre-expresión de genes en la línea celular de cáncer humano HeLa.
- 6) El estado de metilación del DNA no se ve alterado en los promotores de los genes sobre-expresados tras la eliminación de las proteínas MBD.
- 7) El tratamiento con 5-aza-2-desoxicitidina provoca la desmetilación de los promotores de los genes repimidos por la unión de proteínas MBD y los reactiva.
- 8) Los genes sobre-expresados cuyos promotores están hipermetilados de forma aberrante en la línea celular HeLa también están hipermetilados en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano y en tumores primarios.
- 9) La reintroducción en la línea HeLa de los genes sobre-expresados tras la eliminación de las proteínas MBD reduce su capacidad

tumorigénica por lo que podrían tener un papel de genes supresores de tumores.

- 10) Existen al menos 7 isoformas de MBD1 que difieren en el número de dominios CxxC y en el extremo C-terminal de la proteína.
- 11) Las isoformas de MBD1 presentan una mayor afinidad por DNA metilado *in vitro*, aunque tienen una constante de afinidad alta por DNA no metilado que aumenta en las isoformas que contienen el dominio CxxC3.

Bibliografía

- Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, Peterson P (2000) *Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family.* Genomics 65(3), 293-8.
- Aapola U, Liiv I, Peterson P (2002) *Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity.* Nucleic Acids Res 30(16), 3602-8.
- Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K (2007). *UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development.* Nature. Aug 22.
- Ahmad K, Henikoff S (2002). *Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly.* Proc Natl Acad Sci U S A 99 Suppl 4, 16477-84
- Allshire R (2002). *Molecular biology. RNAi and heterochromatin--a hushed-up affair.* Science 297, 1818-9.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999). *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.* Nat Genet. 1999 Oct;23(2), 185-8.
- Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R (1998). *Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing.* Nature 394, 592-5.
- Arber W (1974). *DNA modification and restriction.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 14(0), 1-37.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN (1991). *The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix.* Proc Natl Acad Sci U S A. 88, 10148-52.

- Arents G, Moudrianakis EN (1995). *The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization*. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 92, 11170-4.
- Baarends WM, Roest HP, Grootegoed JA (1999). *The ubiquitin system in gametogenesis*. Mol Cell Endocrinol. 1999 May 25;151(1-2), 5-16.
- Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, Hoeijmakers JH, de Boer P, Grootegoed JA (2005). *Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis*. Mol Cell Biol. 2005 Feb;25(3), 1041-53.
- Bailey KA, Reeve JN (1999). *DNA repeats and archaeal nucleosome positioning*. Res Microbiol 150, 701-9.
- Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, espada J, Cigudosa JC, Huang TH, Esteller M (2003). *Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer*. EMBO J. 22, 6335-6345.
- Ballestar E, Wolffe AP (2001) *Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression*. Eur J Biochem 268(1), 1-6.
- Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T (2002). *Histone methylation: dynamic or static?* Cell 109(7), 801-6.
- Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T (2005). *Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes*. J. Biol.Chem. 280, 177732-177736.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999). *A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA*. Nature 397(6720), 579-83.
- Barber CM, Turner FB, Wang Y, Hagstrom K, Taverna SD, Mollah S, Ueberheide B, Meyer BJ, Hunt DF, Cheung P, Allis CD (2004) *The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved*. Chromosoma 112(7), 360-71.

- Barr H, Hermann A, Berger J, Tsai H, Adie K, Prokhortchouk A, Hendrich B, Bird A (2007). *MBD2 contributes to DNA methylation-directed repression of the Xist gene*. Mol . Cell. Biol. 27(10), 3750-3757.
- Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, handa V, Döderlein G, Maltry N, We W, Lyko F, Niehrs C (2007). *Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation*. Nature 445(8), 671-675.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell. 129(4):823-37.
- Becker PB, Hörz W (2002) *ATP-dependent nucleosome remodeling*. Annu Rev Biochem 71, 247-73.
- Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, Golemis EA, Genuardi M, Neri G (1999). *MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(7), 3969-74.
- Belmont A (2003). *Dynamics of chromatin, proteins, and bodies within the cell nucleus*. Curr Opin Cell Biol 15, 304-10.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature 409(6818), 363-6.
- Berger SL (2001). *An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation*. Oncogene 20, 3007-13.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) *A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA*. Nature 397(6720), 579-83.
- Bird A (2002) *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev 16(1), 6-21.
- Bird A (2007). *Perceptions of epigenetics*. Nature Insights 447, 396-398.

- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) *A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA*. Cell 40(1), 91-9.
- Bjerling P, Silverstein RA, Thon G, Caudy A, Grewal S, Ekwall K (2002). *Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity*. Mol Cell Biol 22, 2170-81.
- Boix i Chornet M (2003). Tesis Doctoral: *Canvis epigenètics de la cromatina associats al programa de mort cel.lular*.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R (2006). *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature 441, 349-353.
- Bradford MM (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72, 248-54.
- Caballero-Velázquez R (2005). Tesis Doctoral: *Nuevas aportaciones a la caracterización del gen Aiolos*.
- Cai GA and Croce CM (2006). *MicroRNA-cancer connection: "the beginning of a new tale"*. Cancer Res. 66, 7390-7394.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004). *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA 10(12), 1957-66.
- Carmen AA, Milne L, Grunstein M (2002). *Acetylation of the yeast histone H4 N terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3*. J Biol Chem. 277(7):4778-81.
- Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe A.P (1999). *The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA*. Biochemistry 38, 7008-7018.

- Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E (2002). *A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation*. J. Biol. Chem 277, 38746-38754.
- Chen X, Zhang X (2007). *Structural Dynamics of protein lysine methylation and demethylation*. Mutat Res. 618 (1-2), 102-115.
- Chen Z, Zang J, Whetstone J, Hong X, Davrazou F, Kutateladze TG, Simpson M, Mao Q, Pan CH, Dai S, Hagman J, Hansen K, Shi Y, Zhang G (2006) *Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members*. Cell, 125(4), 691-702.
- Cheng X, Collins RE, Zhang X (2005) *Structural and Sequence Motifs of Protein (Histone) Methylation Enzymes*. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 34, 267-94.
- Cho KS, Elizondo CF, Boerkoel CF (2004). *Advances in chromatin remodeling and human disease*. Curr. Opin. Genet. Dev. 14, 308-315.
- Costello JF, Plass C (2001). *Methylation matters*. J Med Genet 38, 285–303
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C (2000). *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet 24, 132–8.
- Cremer T, Cremer C (2001). *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*. Nat Rev Genet 2, 292-301.
- Daban JR (2000). *Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures*. Biochemistry 39, 3861-6.
- Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB, Baig A (2002) *The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that*

- recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides.* Nucleic Acids Res. 30(13), 2911-9.
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ (2002). *Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1,9 Å resolution.* J. Mol. Biol. 319, 1097-1113.
- De Lange RJ, Fambrough DM, Smith EL, Bonner J (1969). *Calf and Pea Histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone iv; comparison with the homologous calf thymus histone.* J Biol Chem 244, 5669-79.
- Denman RB (2005) *PAD: the smoking gun behind arginine methylation signaling?* Bioessays 27(3), 242-6.
- Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, Fuks F (2002) *Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase.* Nucleic Acids Res 30(17), 3831-8.
- Dinger ME, Baillie GJ, Musgrave DR (2000). *Growth phase-dependent expression and degradation of histones in the thermophilic archaeon Thermococcus zilligii.* Mol Microbiol 36, 876-85.
- Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ (2004) *Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber.* Science 306(5701), 1571-3.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982). *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.* Nucleic Acids Res. 10, 2709-21.
- Emre NC, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, Henry KW, Li, K Marmorstein R, Greenblatt JF, Shilatifard A, Berger SL (2005) *Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing.* Mol. Cell 17, 585-594.

- Esteller M (2002). *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. *Oncogene* 21, 5427–40.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001). *A gene hypermethylation profile of human cancer*. *Cancer Res.* 61(8), 3225-9.
- Fabbrizio E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee JH, Negre V, Rousset M, Pestka S, Le Cam A, Sardet C (2002) *Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5*. *EMBO Rep.* 3(7), 641-5.
- Felsenfeld G, Groudine M (2003). *Controlling the double helix*. *Nature* 421, 448-53.
- Feng Q, Zhang Y (2001) *The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes*. *Genes Dev.* 15(7), 827-32.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA (2006) *A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription*. *Mol Cell Biol.* 26(1), 169-81.
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP (1999) *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. *Nature* 401(6749), 188-93.
- Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S (2003). *Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains*. *Genes Dev.* 17, 1870-1881.
- Fournier C, Goto Y, Ballestar E, Delaval K, Hever AM, Esteller M, Feil R (2002) *Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes*. *EMBO J.* 21(23), 6560-70.
- Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, Esteller M (2003). *The affinity of different MBD proteins for a specific methylated*

- locus depends on their intrinsic binding properties.* Nucleic Acids Res. 31(6), 1765-74.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. (2005). *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins.* Proc Natl Acad Sci U S A 102(30), 10604-9.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. (2005) *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.* Nat Genet. 37(4), 391-400.
- Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M (2000) *Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1.* Mol Cell Biol. 20(14), 5107-18.
- Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Ohkuma Y, Chiba T, Saya H, Nakao M (2003). *MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression.* Mol. Cell. Biol. 23, 2834–2843 (a).
- Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T, Nakao M (2003). *Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression.* J. Biol. Chem. 278, 24132–24138 (b).
- Fuks F, Hurd P.J, Wolf D, Nan X, Bird A, Kouzarides T (2003). *The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation.* J Biol Chem. 278(6), 4035-40.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) *CpG islands in vertebrate genomes.* J Mol Biol 196(2), 261-82.

- Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling, DE (2005) *Ubp10/Dot4p regulates the persistance of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin*. Mol. Cell. Biol. 25, 6123-6139.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK (2003) *Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines*. Mol Cancer Ther 2(2), 151-63.
- Glass CK and Rosenfeld MG (2000). *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors*. Genes Dev. 14, 121-141.
- Grafi G, Zemach A, Pitto L (2007). *Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants*. Biochim Biophys Acta 1769(5-6), 287-94.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH (2006). *Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. Science 311(5759), 395-8.
- Grunstein M (1997). *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature 389, 349-52.
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Luscher B, Amati B (2007). *Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive*. Nature. Sep 26.
- Guenther MG, Lane WS, Fischle W, Verdin E, Lazar MA, Shiekhata R (2000). *A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness*. Genes Dev. 14, 1048-1057.
- Gurley LR, Walters RA, Tobey RA (1973). *Histone phosphorylation in late interphase and mitosis*. Biochem Biophys Res Commun. 1973 Feb 5;50(3), 744-50.
- Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI (2002). *Establishment and maintenance of a heterochromatin domain*. Science 297, 2232-7.

- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001). *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. Science 293, 1146-1150.
- Hasan S, Hottiger MO (2002) *Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication*. J Mol Med 80(8), 463-74. Epub 2002 May 22.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 789-829.
- Hattori N, Imao Y, Nishino K, Hattori N, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K (2007). *Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells*. Genes Cells. 12(3), 387-96.
- He L, Hannon GJ (2004). *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet. 5(7), 522-31.
- Hendrich B, Bird A (1998) *Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins*. Mol Cell Biol 18(11), 6538-47.
- Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A (1999). *The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites*. Nature. 1999 Sep 16;401(6750), 301-4.
- Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson V.A and Bird A (2001). *Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development*. Genes Dev. 15, 710-723.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997). *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. Chromosoma. 106(6), 348-60.
- Herman JG, Baylin SB (2003). *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med 349, 2042-54.

- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996) *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 9821-9826, 1996.
- Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A (2003). *The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity*. J Biol Chem. 278(34), 31717-21.
- Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M (2006). *HMG chromosomal proteins in development and disease*. Trends Cell Biol. 17(2), 72-79.
- Hogan C, Varga-Weisz P (2007). *The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors*. Mut Res 618, 41-51.
- Holliday R (1994). *Epigenetics: an overview*. Dev Genet 15, 453-7.
- Howe L, Brown CE, Lechner T, Workman JL (1999). *Histone acetyltransferase complexes and their link to transcription*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 9, 231-43.
- Hutchins AS, Mullen AC, Lee HW, Sykes KJ, High F, Hendrich BD, Bird AP, Reiner SL (2002). *Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator*. Mol. Cell 10, 81-91.
- Isogai Y, Tjian R (2003). *Targeting genes and transcription factors to segregated nuclear compartments*. Curr Opin Cell Biol 15, 296-303.
- Jaenisch R, Bird A (2003) *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet 33, 245-54.
- Jenuwein T, Allis CD (2001). *Translating the histone code*. Science 293, 1074-80.
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X (2007). *Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation*. Nature 22.
- Jiang CL, Jin SG, Lee DH, Lan ZJ, Xu X, O'Connor TR, Szabo PE, Mann JR, Cooney AJ, Pfeifer GP (2002). *MBD3L1 and MBD3L2, two new proteins homologous to the methyl-CpG-binding proteins MBD2 and*

- MBD3: characterization of MBD3L1 as a testis-specific transcriptional repressor.* Genomics. 80(6), 621-9.
- Jiang CL, Jin SG, Pfeifer GP (2004). *MBD3L1 is a transcriptional repressor that interacts with methyl-CpG-binding protein 2 (MBD2) and components of the NuRD complex.* J Biol Chem. 279(50), 52456-64.
- Jin SG, Jiang CL, Rauch T, Li H, Pfeifer GP (2005). *MBD3L2 interacts with MBD3 and components of the NuRD complex and can oppose MBD2-MeCP1-mediated methylation silencing.* J Biol Chem. 280(13), 12700-9.
- Jones PA, Laird PW (1999). *Cancer epigenetics comes of age.* Nat Genet 21, 163-7.
- Jørgensen HF, Adie K, Chaubert P, Bird AP (2006). *Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein.* Nucleic Acids Res. 34(13), e96.
- Jørgensen HF, Ben-Porath I, Bird AP (2004) *Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains.* Mol Cell Biol 24(8), 3387-95.
- Ju BG, Lunkay VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (2006) *A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA breaks required for regulated transcription.* Science 312, 1798-1802.
- Kellenberger E, Carlemalm E, Villiger W, Wurtz M, Mory C, Colliex C (1986). *Z-contrast in biology. A comparison with other imaging modes.* Ann N Y Acad Sci 483, 202-28.
- Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H (1986). *DNA methylation affects the formation of active chromatin.* Cell 44, 535-43.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003). *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias.* Cell. 115(2), 209-16.
- Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Vermeulen M, Mann M, Bahler J, Green RD, Kouzarides T (2007). *Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation.* Nature. Sep 26.

- Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird A (2005). *DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to Methyl-CpG*. Mol Cell, 19, 667-678.
- Kondo E, Gu Z, Horii A, Fukushima S (2005) *The Thymine DNA Glycosylase MBD4 Represses Transcription and Is Associated with Methylated p16INK4a and hMLH1 Genes*. Mol Cell Biol 25(11), 4388-96.
- Kouzarides T (2002) *Histone methylation in transcriptional control*. Curr Opin Genet Dev 12(2), 198-209 Erratum in: Curr Opin Genet Dev 12(3), 371.
- Kouzarides T (2007). *Chromatin modifications and their function*. Cell 128, 693-705.
- Kriaucionis S, Bird A (2004). *The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing*. Nucleic Acids Res. 19;32(5), 1818-23.
- Kurdistani SK, Grunstein M (2003) *Histone acetylation and deacetylation in yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol 4(4), 276-84.
- Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T (2003) *An epigenetic road map for histone lysine methylation*. J Cell Sci 116(Pt 11):2117-24.
- Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstone JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y (2007). *A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development*. Nature. Sep 12.
- Laroche T, Martin SG, Gotta M, Gorham HC, Pryde FE, Louis EJ, Gasser SM (1998). *Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres*. Curr Biol 8, 653-6.
- Le Guezennec X, Vermeulen M, Brinkman AB, Hoeijmakers WA, Cohen A, Lasonder E, Stunnenberg HG (2006). *MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties*. Mol Cell Biol 26(3), 843-51.

- Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhhattar R (2007). *Demethylation of H3K27 Regulates Polycomb Recruitment and H2A Ubiquitination*. Science. Aug 30.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2004). *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature. 425(6956), 415-9.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004). *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J. 23(20), 4051-60.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992) *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA*. Cell 69, 905-914.
- Li E (2002). *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nature Reviews Genetics 3, 662-673.
- Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS (2006). *Targeting histone deacetylase in cancer therapy*. Med Res Rev. 26(4), 397-413.
- Liu L, Wylie RC, Andrews LG, Tollefsbol TO (2003) *Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection*. Mech Agein Dev 124 (10-12), 989-98.
- López-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setién F, Esteller M (2006). *A profile of Methyl-CpG binding domain proteins occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer*. Cancer Res. 66, 8342-8346.
- Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD (1987). *Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones*. Cell 49, 203-10.
- Luczak MW and Jagodzinski PP (2006). *The role of DNA methylation in cancer development*. Folia Histochemica et Cytobiologica 44(3), 143-154.

- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature 389, 251-60.
- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M (2007). *Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells*. Cancer Res. 67(4), 1424-9. Erratum in: Cancer Res. 2007, 67(7), 3492.
- Lund AH, van IJcken M (2004) *Epigenetics and cancer*. Genes Dev 18(19), 2315-35.
- Lyst MJ, Nan X, Stancheva I (2006). *Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins*. EMBO J 15;25(22), 5317-28.
- Mai A, Massa S, Rotili D, Carbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R (2005) *Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy*. Medicinal Research Reviews 25 (3), 261-308.
- Marfellaa CGA y Imbalzano NA (2007). *The Chd family of chromatin remodelers*. Mut Res. 618, 30-40.
- Marky NL, Manning GS (1995). *A theory of DNA dissociation from the nucleosome*. J Mol Biol 254, 50-61.
- Marmorstein R (2001) *Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol 2(6), 422-32.
- Matarazzo MR, De Bonis ML, Strazzullo M, Cerase A, Ferraro M, Vastarelli P, Ballestar E, Esteller M, Kudo S, D'Esposito M (2007). *Multiple binding of Methyl-CpG and Polycomb proteins in long-term gene silencing events*. J Cell Physiol 210, 711-719.
- McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ, Kunst HPM, Green GE, Shpargel KB, Runge C, Huybrechts C, Mueller RF, Lynch E, King MC, Brunner HG, Cremers CWRJ, Takanosu M, Li SW, Arita M, Mayne R, Prockop DJ,

- Van Camp G, Smith RJH (1999). *Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13)*. Nature Genet. 23, 413-419.
- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP (1989). *Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs*. Cell 58, 499-507.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R (2005) *LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription*. Nature 437, 436-439.
- Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, Keightley PD, Bishop SM, Clarke AR, Bird A (2002). *Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice*. Science. 297(5580), 403-5.
- Min J, Zhang Y, Xu RM (2003). *Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27*. Genes Dev. 17, 1823-1828.
- Minucci S, Pelicci PG (2006). *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer*. Nat Rev Cancer. 6(1), 38-51.
- Miyake K, Nagai K (2007). *Phosphorylation of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) regulates the intracellular localization during neuronal cell differentiation*. Neurochemistry internacional 50, 264-270.
- Moazed D, Bühler M, Buker SM, Colmenares SU, Gerace EL, Gerber SA, Hong EJ, Motamedi MR, Verdel A, Villén J, Gygi SP (2006). *Studies on the Mechanism of RNAi-dependent Heterochromatin Assembly*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71, 461-71.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2006). *Epigenetic reprogramming in mammals*. Hum Mol Genet. 14 Spec No 1, R47-58.

- Nan X, Meehan RR, Bird A (1993). *Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2*. Nucleic Acid Res. 21, 4886-4892.
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997). *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. Cell 21;88(4), 471-81.
- Nan X, Tate P, Li E, Bird A (1996) *DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2*. Mol Cell Biol. 16(1), 414-21.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL (2006) *Histone sumoylation is a negative regulator in Saccharomyces cerevesiae and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications*. Genes Dev. 20, 966-976.
- Ng, HH, Jeppesen, P and Bird, A (2000). *Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1*. Mol. Cell. Biol. 20, 1394–1406.
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A (1999). *MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex*. Nat Genet. 23(1), 58-61.
- Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N (1999). *Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain*. Biochim. Biophys. Acta 1444, 148-151.
- Nelson CJ, Santos-Rosa H, ouzarides T (2006) *Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression*. Cell 126, 905-916.
- Ohki I, Shimotake N, Fujita N, Nakao M, Shirakawa M (1999). *Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD1*. EMBO J. 18(23), 6653-61.

- Okano M, Xie S, Li E (1998). *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res. 26(11), 2536-40.
- Olski TM, Noegel AA, Korenbaum E (2001). *Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily*. J Cell Sci. 114, 525-538.
- Ooi SKT, Qi C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin S, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007). *DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA*. Nature 448, 714-718.
- Ouzounis CA, Kyrpides NC (1996). *Parallel origins of the nucleosome core and eukaryotic transcription from Archaea*. J Mol Evol 42, 234-9.
- Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S (2004). *Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes*. Mol Cell Biol. 24(21), 9630-45.
- Pavri R, Zhu B, Li G, Trojer P, Mandal S, Shilatifard A, Reinberg D (2006). *Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II*. Cell 125, 703-717.
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M (2003). *A specific profile of DNA methylation in human cancer cell lines*. Cancer Res. 63(5), 1114-21.
- Pereira SL, Reeve JN (1998). *Histones and nucleosomes in Archaea and Eukarya: a comparative analysis*. Extremophiles 2, 141-8.
- Peters AH, Schubeler D (2005) *Methylation of histones: playing memory with DNA*. Curr Opin Cell Biol 17(2), 230-8.
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E (2001) *The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor*. Genes Dev 15(13), 1613-8.

- Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, Caballero IM, Salozhin S, Aithozhina D, Cerchietti L, Meng FG, Augenlicht LH, Mariadason JM, Hendrich B, Melnick A, Prokhortchouk E, Clarke A, Bird A (2006). *Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer*. Mol Cell Biol 26(1), 199-208.
- Qin S, Parthun MR (2002). *Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol 22, 8353-65.
- Rajewsky N, Socci ND (2004). *Computational identification of microRNA targets*. Dev Biol. 267(2), 529-35.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002). *Histone H2A variants H2AX and H2AZ*. Curr Opin Genet Dev 12, 162-9.
- Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, Masciullo V, Genuardi M, Paravatou-Petsotas M, Bassi DE, Ruggeri BA, Klein-Szanto AJ, Testa JR, Neri G, Bellacosa A (1999). *The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability*. Nat Genet. 23(3), 266-8.
- Richmond TJ, Davey CA (2003). *The structure of DNA in the nucleosome core*. Nature 423, 145-50.
- Ringrose L and Paro R (2004). *Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins*. Annu. Rev. Genet. 38, 413-443.
- Rho TY, Cuddapah S, Zhao K (2005). *Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping*. Genes dev. 19, 542-552.
- Roloff TC, Ropers HH, Nuber UA (2003). *Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins*. BMC Genomics. 4:1, 1-9.
- Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M, Caballero R, Alaminos M, Setien F, Paz MF, Herranz M, Palacios J,

- Arango D, Orntoft TF, Aaltonen LA, Schwartz S Jr, Esteller M (2006). *A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition*. Nat Genet. 38(5), 566-9.
- Ruzov A, Dunican DS, Prokhortchouk A, Pennings S, Stancheva I, Prokhortchouk E, Meehan RR (2004) *Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development*. Development. 131(24), 6185-94.
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR (2006) *Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones*. Nat Rev Mol Cell Biol. 7, 437-447.
- Sakamoto Y, Watanabe S, Ichimura T, Kawasuji M, Koseki H, Baba H, Nakao M (2007). *Overlapping roles of methylated DNA-binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HOXA genes and heterochromatin foci formation*. J. Biol. Chem. 282(22), 16391-16400.
- Sandman K, Pereira SL, Reeve JN (1998). *Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome*. Cell Mol Life Sci 54, 1350-64.
- Sansam RC and Roberts CW (2006). *Epigenetics and cancer: altered chromatin via Snf5 loss leads to aberrant cell cycle regulation*. Cell Cycle 5, 621-624.
- Sansom OJ, Berger J, Bishop SM, Hendrich B, Bird A, Clarke AR (2003). *Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis*. Nat Genet 34(2), 145-7.
- Sansom OJ, Maddison K, Clarke AR (2007). *Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential targets in cancer*. Nat Clin Pract Oncol. 4(5):305-15.
- Santoro R y Grummt I (2001). *Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription*. Mol Cell. 8, 719-725.

- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002). *Active genes are trimethylated at K4 of histone H3*. Nature 419, 407–411.
- Sarraf SA and Stancheva I (2004). *Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1 to DNA Replication and Chromatin Assembly*. Moll Cell 27;15(4), 595-605.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004). *A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin*. Genes Dev. 18, 1251-1262.
- Sekimata M, Takahashi A, Murakami-Sekimata A, Homma Y (2001). *Involvement of a novel zinc finger protein, MIZF, in transcriptional repression by interacting with a methyl-CpG-binding protein, MBD2*. J Biol Chem 16;276(46), 42632-8.
- Sekimata M, Homma Y (2004) *Sequence-specific transcriptional repression by an MBD2-interacting zinc finger protein MIZF*. Nucleic Acids Res. 29;32(2), 590-7.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell 119(7), 941-53.
- Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D (2003) *Histone lysine methylation: a signature for chromatin function*. Trends Genet 19(11):629-39.
- Slesarev AI, Belova GI, Kozyavkin SA, Lake JA (1998). *Evidence for an early prokaryotic origin of histones H2A and H4 prior to the emergence of eukaryotes*. Nucleic Acids Res 26, 427-30.
- Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C (2001). *Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies*. Hum Mol Genet 10, 1413–9.

- Smith MM (2002). *Centromeres and variant histones: what, where, when and why?* Curr Opin Cell Biol 14, 279-85.
- Strahl BD, Allis CD (2000). *The language of covalent histone modifications.* Nature 403, 41-5.
- Straub T and Becker PB (2007). *Dosage compensation: the beginning and end of generalization.* Nat. Genet. Rev. 8, 47-57.
- Sullivan SA, Landsman D (2003). *Characterization of sequence variability in nucleosome core histone folds.* Proteins 52, 454-65.
- Sun ZW, Allis CD (2002). *Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast.* Nature 418, 104-8.
- Takeuchi T (1997). *A gene trap approach to identify genes that control development.* Dev Growth Differ 39, 127-134.
- Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, Higashinakagawa T (1995). *Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation.* Genes Dev 9, 1211-1222.
- Talasz H, Lindner HH, Sarg B, Helliger W (2005). *Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding-regions of active genes and correlates with hyperacetylation.* J. Biol. Chem. 280, 38814-38822.
- Thatcher TH, Gorovsky MA (1994). *Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4.* Nucleic Acids Res 22, 174-9.
- Thomas JO, Kornberg RD (1975). *Cleavable cross-links in the analysis of histone-histone associations.* FEBS Lett 58, 353-8.
- Travers AA (2003). *Priming the nucleosome: a role for HMG proteins?* EMBO Rep 4, 131-6.
- Trewick SC, McLaughlin PJ, Allshire RC (2005) *Methylation: lost in hydroxylation?* EMBO Rep 6(4), 315-20.
- Tsukada YI, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006). *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins.* Nature 439, 811-816.

- Vacca M, Filippini F, Budillon A, Rossi V, Mercadante G, Manzati E, Gualandi F, Bigoni S, Trabanelli C, Pini G, Calzolari E, Ferlini A, Meloni I, Hayek G, Zappella M, Renieri A, D'Urso M, D'Esposito M, MacDonald F, Kerr A, Dhanjal S, Hulten M (2001). *Mutation analysis of the MeCP2 gene in British and Italian Rett syndrome female*. J Mol Med. 78(11), 648-55.
- Vakoc CR, Mandat SA, Olenchok BA, Blobel GA (2005) *Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin*. Mol Cell. 19 (3), 381-91.
- Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA (2006). *Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin*. Mol. Cell. Biol. 26, 9185-9195.
- van Holde KE (1998). *Chromatin*. Springer-Verlag New York.
- Varizi H (2001). *hSir2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase*. Cell 107, 149-159.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SIS, Moazed D (2004). *RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RIST complex*. Science 303, 672-676.
- Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB (1996). *De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase*. Mol Cell Biol 16(8), 4555-65.
- Vignali M, Hassan AH, Neely KE, Workman JL (2000). *ATP-dependent chromatin-remodeling complexes*. Mol Cell Biol 20, 1899-910.
- Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinder JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F (2006). *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. Nature 439, 871-874.
- Wakefield RI, Smith BO, Nan X, Free A, Soteriou A, Uhrin D, Bird AP, Barlow PN (1999). *The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA*. J Mol Biol. 3; 291(5), 1055-65.

- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y (2006) *Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage*. Mol Cell 22, 383-394.
- Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD (1998). *Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena*. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 95, 7480-4.
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD (1999). *Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation*. Cell 97, 99-109.
- Weintraub H, Groudine M (1976). *Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation*. Science 193, 848-56.
- Wolffe A, Jones PL and Wade PA (1999). *DNA demethylation*. Proc. Natl. Acad Sci. USA 96, 5894-5896.
- Woo H.R, Pontes O, Pikaard CS, Richards EJ (2007). *VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization*. Genes Dev 21(3), 267-77.
- Wu Ct, Morris JR (2001). *Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence*. Science 293, 1103-5.
- Yang XX, Seto E (2003). *Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression*. Curr Opin Genet Dev 13, 143-153.
- Yoon H, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J (2003). *N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding Proteins Kaiso*. Mol Cell. 12, 723-734.
- Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, Kang D, Richman R, Johnson JM, Berget S, Zoghbi HY (2005). *Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional*

- repressor methyl-CpG binding protein 2*. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 102(49), 17551-17558.
- Zhang Y, Reinberg D (2001). *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev. 15(18), 2343-60.
- Zhao X, Ueba T, Christie BR, Barkho B, McConnell MJ, Nakashima K, Lein ES, Eadie BD, Willhoite AR, Muotri AR, Summers RG, Chun J, Lee K, Gage FH (2003). *Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function*. Proc Natl Acad Sci U S A 100 (11), 6777-6782.
- Zhou Y, Grummt I (2005). *The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing*. Curr Biol. 15(15):1434-8.
- Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2005). *Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation*. Mol. Cell 20, 601-611.

Anexo I

A continuación se incluyen los resúmenes de otras publicaciones científicas en las que ha participado el doctorando durante el período predoctoral:

Nucleic Acids Res. 2007;35(7):2191-8.

Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells.

Espada J, Ballestar E, Santoro R, Fraga MF, Villar-Garea A, Németh A, **Lopez-Serra L**, Ropero S, Aranda A, Orozco H, Moreno V, Juarranz A, Stockert JC, Längst G, Grummt I, Bickmore W, Esteller M.

Cancer Epigenetics Laboratory, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain.

The nucleolus is the site of ribosome synthesis in the nucleus, whose integrity is essential. Epigenetic mechanisms are thought to regulate the activity of the ribosomal RNA (rRNA) gene copies, which are part of the nucleolus. Here we show that human cells lacking DNA methyltransferase 1 (Dnmt1), but not Dnmt3b, have a loss of DNA methylation and an increase in the acetylation level of lysine 16 histone H4 at the rRNA genes. Interestingly, we observed that SirT1, a NAD⁺-dependent histone deacetylase with a preference for lysine 16 H4, interacts with Dnmt1; and SirT1 recruitment to the rRNA genes is abrogated in Dnmt1 knockout cells. The DNA methylation and chromatin changes at ribosomal DNA observed are associated with a structurally disorganized nucleolus, which is fragmented into small nuclear masses. Prominent nucleolar proteins, such as Fibrillarin and Ki-67, and the rRNA genes are scattered throughout the nucleus in Dnmt1 deficient cells. These findings suggest a role for Dnmt1 as an epigenetic caretaker for the maintenance of nucleolar structure.

Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos.

Caballero R, Setien F, **Lopez-Serra L**, Boix-Chornet M, Fraga MF, Ropero S, Megias D, Alaminos M, Sanchez-Tapia EM, Montoya MC, Esteller M, Gonzalez-Sarmiento R, Ballestar E.

Cancer Epigenetics Laboratory, Molecular Pathology Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain.

The transcription factor Aiolos (also known as IKZF3), a member of the Ikaros family of zinc-finger proteins, plays an important role in the control of B lymphocyte differentiation and proliferation. Previously, multiple isoforms of Ikaros family members arising from differential splicing have been described and we now report a number of novel isoforms of Aiolos. It has been demonstrated that full-length Ikaros family isoforms localize to heterochromatin and that they can associate with complexes containing histone deacetylase (HDAC). In this study, for the first time we directly investigate the cellular localization of various Aiolos isoforms, their ability to heterodimerize with Ikaros and associate with HDAC-containing complexes, and the effects on histone modification and binding to putative targets. Our work demonstrates that the cellular activities of Aiolos isoforms are dependent on combinations of various functional domains arising from the differential splicing of mRNA transcripts. These data support the general principle that the function of an individual protein is modulated through alternative splicing, and highlight a number of potential implications for Aiolos in normal and aberrant lymphocyte function.